



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2010

**Bruno Miguel
Barbosa da Costa**

Terapia Fágica: Perspectivas na Aplicação Clínica



**Bruno Miguel
Barbosa da Costa**

Terapia Fágica: Perspectivas na Aplicação Clínica

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob orientação científica da Professora Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

“ A história da doença é em última análise a história da luta
entre as bactérias e os bacteriófagos”

d'Herelle

O júri

Presidente

Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Vogais

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves (arguente)

Investigador Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente do Mar (CESAM)

Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida (orientadora)

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Os meus agradecimentos vão para todos aqueles que sempre me apoiaram e que de certo modo contribuíram para a minha formação pessoal e profissional. Deste modo não poderei deixar de agradecer:

Ao Professor Doutor António Carlos Matias Correia, coordenador do Mestrado de Microbiologia da Universidade de Aveiro, pela disponibilidade prestada para encontrar um tema e um orientador para a minha dissertação;

À Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, orientadora científica desta dissertação, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, pelo acolhimento, acompanhamento e pela orientação, disponibilidade e formação;

A todas as pessoas que sempre acreditaram em mim e que sempre estiveram presentes nos momentos mais importantes da minha vida.

Palavras-chave

Bactérias patogénicas, resistência a antibióticos, terapia fágica

Resumo

A terapia fágica foi utilizada entre 1921 e 1940 para tratar diversas infecções humanas. Com o aparecimento dos antibióticos em 1945 a terapia fágica foi abandonada no Mundo Ocidental, ao contrário do que aconteceu nos países de Leste que a utilizaram em grande escala para tratar infecções humanas. As primeiras resistências aos antibióticos não tardaram em aparecer, sendo cada vez mais frequente o isolamento de estirpes multiresistentes. Actualmente estudam-se novas alternativas à antibioterapia para combater este grave problema de saúde pública. Uma das alternativas à antibioterapia é a terapia fágica cujo interesse renasceu pelas potencialidades que os fagos apresentam relativamente aos antibióticos no combate a infecções humanas.

Com o objectivo de explorar as potencialidades e aplicações clínicas da terapia fágica, procedeu-se a uma revisão bibliográfica, desde a génese da aplicação da terapia fágica em humanos até à actualidade.

Através de grande parte dos conhecimentos práticos adquiridos da experiência dos países de Leste no domínio da terapia fágica, o Mundo Ocidental apresentou muito recentemente resultados favoráveis de ensaios clínicos desenvolvidos. Um dos grandes desafios a superar é mesmo a falta de regulamentação adaptada à terapia fágica.

A terapia fágica caminha, ainda que timidamente, para um futuro promissor no âmbito da sua aplicação clínica entre muitas outras potenciais aplicações noutros domínios.

Keywords

Pathogenic bacteria, antibiotic resistance, phage therapy

Abstract

Phage therapy was used between 1921 and 1940 to treat diverse infections of human beings. With the advent of antibiotics in 1945, phage therapy was abandoned in the western world, unlike what happened in eastern countries, which have used it on a large scale to treat human infections. However, the first resistance to antibiotics appeared soon, being today each time more frequent the isolation of multi-resistant bacterial strains. Currently, new alternatives to antibiotics have been studied to combat this serious public health problem. Phage therapy is an alternative to antibiotic, which interest was reborn due to phage potential to destroy infectious bacteria, including multi-resistant strains.

In order to explore the potentials and clinical applications of phage therapy, a literature review was done, providing information since the genesis of their application in humans until today.

Through much of the practical knowledge gained from the experience of east european countries in the field of phage therapy, the western world very recently presented favourable results of clinical trials developed.

One of the great challenges to surpass is the lack of suitable regulation to phage therapy implementation. Phage therapy walks, although modestly, to a promising future as part of its clinical application among many other potential applications in other fields.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIII
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Descoberta dos fagos	2
1.2 Propriedades dos bacteriófagos	3
1.3 Taxonomia dos fagos	4
1.4 Princípios de infecção pelos bacteriófagos	6
1.4.1 Hospedeiros bacterianos	6
1.4.2 Infecção bacteriofágica	8
CAPÍTULO 2 – RESISTÊNCIAS AOS ANTIBIÓTICOS.....	11
2.1 Breve abordagem sobre a descoberta dos antibióticos	12
2.2 Mecanismos de acção dos antimicrobianos.....	13
2.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.....	14
2.3.1 Resistência em bactérias Gram negativo	15
2.3.1.1 β -lactamases de espectro expandido (ESBLs).....	15
2.3.1.2 AmpC.....	16
2.3.1.3 Metalo- β -lactamases	16
2.3.1.4 Resistência às fluoroquinolonas	18
2.3.2 Resistência em bactérias Gram positivo.....	18
2.3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina	18
2.3.2.2 Pneumococos resistentes à penicilina	19
2.3.2.3 Enterococos multiresistentes	20
2.3.3 Resistências em micobactérias	21
2.3.4 Resistência aos antibióticos no meio ambiente e em animais.....	21

2.4 Factores de risco para o desenvolvimento de resistências.....	22
2.5 Controlo da resistência aos antimicrobianos.....	23
2.6 Novos antibióticos.....	23
2.7 Novas alternativas aos antibióticos.....	24
 CAPÍTULO 3 – TERAPIA FÁGICA: CONCEITOS E APLICAÇÕES GERAIS	26
3.1 Escolha, isolamento e preparação de fagos para a terapia fágica.....	26
3.2 Pré-requisitos para a terapia fágica	26
3.3 Aplicações gerais da terapia fágica	27
3.3.1 Aquacultura	27
3.3.2 Veterinária	28
3.3.3 Agricultura	28
3.3.4 Indústria Alimentar.....	28
3.3.5 Prevenção e tratamento de infeções humanas	29
3.4 Desenvolvimento de produtos fágicos: comercialização.....	29
 CAPÍTULO 4 – TERAPIA FÁGICA APLICAÇÕES CLÍNICAS	32
4.1 Breve história da terapia fágica na prática clínica	33
4.2 Terapia fágica na Europa de Leste: passado, presente e futuro.....	34
4.2.1 Geórgia.....	34
4.2.1.1 Principais aplicações clínicas da terapia fágica na Geórgia.....	36
4.2.2 Polónia	40
4.2.2.1 Principais aplicações clínicas da terapia fágica na Polónia	40
4.3 Terapia fágica no Ocidente: passado, presente e futuro	42
4.3.1 Otites provocadas por <i>Pseudomonas</i> : fase I/II de ensaio clínico na Grã-Bretanha	42
4.3.2 Infeções em queimados: fase I dos ensaios clínicos na Bélgica.....	43
4.3.3 Ensaios clínicos fase I iniciados por médicos em Lubbock no Texas	45
4.4 Terapia fágica em Portugal.....	45

4.5 Estudos experimentais: contributo de estudos em animais para o desenvolvimento da terapia fágica em humanos	46
4.6 Estudos experimentais: isolamento e caracterização de fagos para o combate a algumas das bactérias mais patogénicas	48
CAPÍTULO 5 – VANTAGENS DA TERAPIA FÁGICA FACE À ANTIBIOTERAPIA	49
5.1 Limites e controvérsias da antibioterapia	50
5.2 Vantagens e desvantagens da terapia fágica.....	51
5.3 Breve abordagem à farmacocinética e farmacodinâmica dos fagos no ser humano	53
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
BIBLIOGRAFIA	57

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsDNA - Ácido desoxirribonucleico da cadeia dupla

dsRNA - Ácido ribonucleico da cadeia dupla

EARSS - *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*

ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EMA - *European Medicines Agency*

ESBLs - β -lactamases de espectro expandido

FDA - *Food and Drug Administration*

GIM - German imipenemase

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IMP - Imipenemase

MBL - Metallo- β -lactamases

MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

MRSA-CA - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina Adquiridos na Comunidade

OMS - Organização Mundial de Saúde

RNA - Ácido ribonucleico

SPM - São Paulo metalo- β -lactamase

ssDNA - Ácido desoxirribonucleico da cadeia simples

ssRNA - Ácido ribonucleico da cadeia simples

UCI - Unidade de Cuidados Intensivos

VIM - Verona imipenemase

VRE - Enterococos Resistentes à Vancomicina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Estrutura de um bacteriófago do tipo T4 (Adaptado de Hanlon, 2007).....	3
Figura 1.2 - Representação morfológica dos bacteriófagos (Adaptado de Ackermann, 2007)...	5
Figura 1.3 - Constituição da parede celular de uma bactéria Gram positivo (Adaptado Pádua, 2009).....	6
Figura 1.4 - Constituição da parede celular de uma bactéria Gram negativo (Adaptado de Pádua, 2009).....	7
Figura 2.1: Distribuição Mundial de VIM-2 (Adaptado de Harkey e Jones, 2009).....	17
Figura 2.2: Proporção Europeia de <i>Enterococcus faecium</i> resistentes à vancomicina em 2007 (Adaptado de EARRS, 2007).....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Principais características e famílias de fagos (Adaptado de Ackermann, 2007).....	5
Tabela 1.2: Etapas que caracterizam a adsorção (Adaptado de Kutter e Sulakvelidze, 2005; Calender 2006).....	8
Tabela 1.3: Respostas possíveis após entrada do material genético fágico na bactéria (Adaptado de Gregoracci, 2006; Hanlon, 2007).....	9
Tabela 2.1: Mecanismos de acção dos antimicrobianos (Adaptado de Tenover, 2006; Correia, 2009).....	13
Tabela 2.2: Mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Adaptado de Cunha, 2009; Correia, 2009).....	14
Tabela 2.3: Práticas associadas com o desenvolvimento de resistência a antibióticos (Adaptado de Correia, 2009; Cunha <i>et al</i> , 2009).....	22
Tabela 3.1: Pré-requisitos para a utilização de fagos na terapia fágica (Adaptado de Skurnik e Straunch, 2006).....	27
Tabela 3.2: Principais empresas relacionadas com a comercialização de produtos fágicos (Adaptado de Housby and Mann, 2009).....	30
Tabela 4.1: Exemplos de preparações de fagos desenvolvidos pelo Instituto Eliava: Principais aplicações e resultados obtidos (Adaptado de Chanishvili e Sharp, 2008; Kutateladze e Adamia, 2008; Kutter <i>et al</i> , 2010).....	39
Tabela 4.2: Alguns estudos experimentais em animais recentemente desenvolvidos tendo em vista a aplicação da terapia fágica humana.....	47
Tabela 4.3: Estudos experimentais mais recentes de isolamento e caracterização de alguns fagos para futuros ensaios.....	48
Tabela 5.1: Principais desvantagens da antibioterapia (Adaptado de Paisano, 2008; Parisien <i>et al</i> , 2008; Kutter <i>et al</i> , 2010).....	50
Tabela 5.2: Principais vantagens da terapia fágica face à antibioterapia (Adaptado de Matsuzaki <i>et al</i> , 2005; Clark e March, 2006; Paisano, 2008; Henriques, 2008).....	51
Tabela 5.3: Principais mecanismos de resistência das bactérias aos fagos (Adaptado de Skurnik e Strauch, 2006).....	52

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Descoberta dos fagos

Em 1896 Ernest Hanking, na Inglaterra, referiu ter observado uma elevada actividade antibacteriana (contra o *Vibrio cholerae*) nas águas dos rios Ganges e Jumna na Índia (Summers, 2005). Perante tal fenómeno Ernest Hanking, sugeriu que uma substância desconhecida seria a principal responsável pela elevada actividade antibacteriana, travando assim a expansão de epidemias de cólera (Sillankorva, 2004). Dois anos mais tarde Gamaleya, na Rússia, observou um fenómeno semelhante, neste caso concreto com *Bacillus subtilis* (Dublanche e Fruciano, 2008). Fenómenos idênticos foram observados e relatados por vários investigadores, não sendo estas descobertas muito exploradas.

Foram necessárias quase duas décadas após a descrição dos acontecimentos anteriormente referenciados para que dois bacteriologistas descobrissem os fagos (Sulakvelidze *et al*, 2001; Dublanche e Fruciano, 2008). Frederick Twort (1915) na Inglaterra acendeu de novo a chama da descoberta dos fagos quando tentava fazer com que crescessem vírus em meios de cultura artificiais (Levine, 1939). A contaminação das placas com bactérias permitiu a Twort observar que algumas colónias bacterianas apresentavam um aspecto transparente e que não se reproduziam, sofrendo lise (Sulakvelidze *et al*, 2001). Em 1915 Twort chega a publicar um artigo onde descreve este acontecimento em que o cientista presume que uma explicação para a sua experiência seria a descoberta de um vírus capaz de lisar as bactérias (Levine, 1939). A verdadeira descoberta dos fagos deu-se dois anos mais tarde com Félix d'Herelle em França (Paisano, 2008). Um grave surto de disenteria hemorrágica entre as tropas francesas durante a Primeira Guerra Mundial, esteve na origem da descoberta dos fagos (Sillankorva, 2004). Este cientista observou que a inoculação das fezes dos doentes em meios de cultura para exame microbiológico provocava o aparecimento de pequenas manchas circulares, às quais denominou de placas, de lise bacteriana, sendo que após um dia de incubação todas as bactérias estavam mortas (Sulakvelidze *et al*, 2001). Durante este estudo constatou que o tempo de aparecimento desta lise era exactamente o tempo que o paciente demorava a ficar curado (Summers, 2005). D'Herelle denominou este grupo de vírus como bacteriófagos (Dublanche e

Fruciano, 2008). Vários foram os estudos realizados no mesmo âmbito e em pouco tempo d'Herelle conseguiu isolar fagos de outras bactérias patogénicas causadoras de doenças como a cólera, a difteria entre outras (Skurnik e Strauch, 2006). Em paralelo com estes estudos desenvolve um método de quantificação de vírus, assim como outras teorias como o ciclo de replicação dos fagos, sendo considerado o Pai da Virologia Moderna (Gregoracci, 2006).

1.2. Propriedades dos bacteriófagos

Geralmente, os fagos assemelham-se a outros vírus, sendo constituídos por dois componentes essenciais as proteínas e o ácido nucleico (Henriques, 2008). Dependendo do tipo de fago, este pode apresentar DNA ou RNA como ácido nucleico, podendo a cadeia de ácido nucleico ser simples ou dupla e linear, circular, segmentada ou super helicoidal (Halon, 2007; Henriques, 2008). Os bacteriófagos (fagos), podem apresentar diferentes tamanhos e formas, sendo na sua maioria constituídos por uma cabeça e por uma cauda (Figura 1.1) (Halon, 2007). A cabeça é constituída pela cápside que é composta por várias cópias de uma ou mais proteínas diferentes, onde internamente se encontra o genoma viral (Pereira, 2009). A cauda é uma estrutura contráctil que se liga à cabeça, sendo através deste elemento que o ácido nucleico passa para as células hospedeiras durante a infecção (Halon, 2007; Henriques, 2008). Geralmente encontram-se ligadas à extremidade da cauda seis fibras em que nas suas extremidades se encontram receptores que permitem o reconhecimento dos locais de fixação na superfície da célula hospedeira (Pereira, 2009).

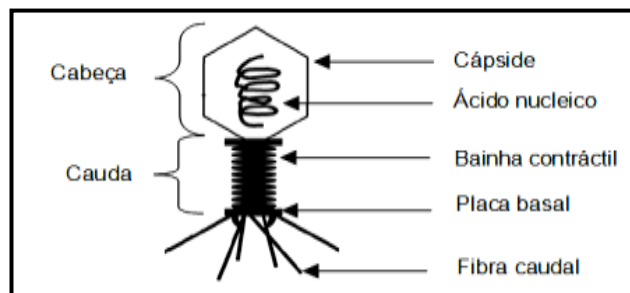


Figura 1.1: Estrutura de um bacteriófago do tipo T4 (Adaptado de Hanlon, 2007).

1.3 Taxonomia dos fagos

A classificação taxonómica dos fagos passou por várias fases após a sua descoberta. Entre 1920 e 1930 foram-se descobrindo e observando diferentes tipos de fagos o que permitiu estabelecer uma primeira classificação dos fagos (Fauquet *et al*, 2005; Akermann, 2007). Anos mais tarde entre 1940 e 1950, com o aparecimento do microscópio electrónico já era possível medir o tamanho dos fagos, o comprimento das fibras da cauda, simetria da cápside, surgindo assim uma taxonomia baseada na morfologia dos diferentes fagos (Akermann, 2007). Com o evoluir da ciência não tardou o aparecimento dos métodos bioquímicos para o isolamento de ácidos nucleicos dos fagos e em 1960 já era possível acrescentar mais informações relativas aos fagos (Fauquet *et al*, 2005; Hambly e Suttle, 2005). Do congresso Internacional de Microbiologia em 1966 em Moscovo surge a *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) cuja missão seria desenvolver um sistema internacional taxonómico para classificar todos os vírus que infectam os animais, plantas, fungos e bactérias (Fauquet *et al*, 2005; Akermann, 2007). Desde o primeiro relatório em 1971 até ao mais recente relatório (oitavo) em 2005 que existem constantes actualizações na taxonomia dos vírus pela ICTV, em que para além dos vírus que infectam bactérias a descoberta de vírus que infectam *Archae* tem levado ao conhecimento de novas famílias de fagos (Fauquet *et al*, 2005).

Desde 1959 que já foram estudados mais de 5100 fagos dos quais cerca de 96% possuem cauda e pertencem a três famílias, *Myoviridae*, *Siphoviridae* e *Podoviridae* (Weber-Dabrowska *et al*, 2005). Os fagos poliédricos, filamentosos e pleomórficos representam cerca de 3 a 4% do total de fagos e encontram-se inseridos em dez famílias (Figura 1.2) (Gregoracci, 2006; Akermann, 2007). De acordo com a ICTV, os fagos são classificados de acordo com a sua morfologia, propriedades físico-químicas e físicas, proteínas, lípidos e propriedades biológicas (Fauquet *et al*, 2005). Na tabela 1.1 encontram-se representadas as principais famílias de fagos assim como as suas principais características. Recentemente foram descobertos cinco novos tipos de bacteriófagos em fontes termais vulcânicas (SH1, STV1, *Ampullaviridae*, *Bicaudaviridae* e *Globuloviridae*), aguardando classificação pela ICTV (Ackermann, 2007).

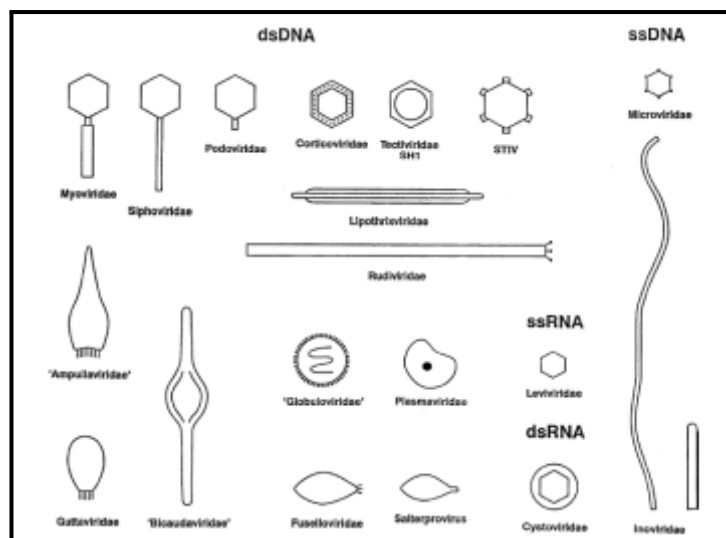


Figura 1.2: Representação morfológica dos bacteriófagos (Adaptado de Ackermann, 2007)

Tabela 1.1: Principais características e famílias de fagos (Adaptado de Ackermann, 2007)

Forma	Ácido Nucleico	Grupo de Virus	Particularidades	Exemplo
Cauda	DNA, 2,L	<i>Myoviridae</i>	Cauda contráctil	T4
		<i>Siphoviridae</i>	Cauda longa não contráctil	λ
		<i>Podoviridae</i>	Cauda curta	T7
Polihédrico	DNA, 1,C	<i>Microviridae</i>	Capsómeros	ΦX174
		<i>Corticoviridae</i>	Capside complexo, lípidos	PM2
		<i>Tectiviridae</i>	Vesícula lipidica interior	PRD1
			pseudocauda	
	DNA, 2,L	<i>Grupo SH1*</i>	Vesícula lipidica interior	SH1
		<i>Grupo STV1*</i>	Torre	STIV
	RNA 1,L	<i>Leviviridae</i>	Tipo poliovirus	MS2
		<i>Cystoviridae</i>	Invólucro, lípidos	Φ6
Filamentosos	DNA 1,C	<i>Inoviridae</i>	a.filamentos longos	fd
			b.hastes curtas	MVL1
		<i>Lipothrixviridae</i>	Invólucro, lípidos	TTV1
		<i>Rudiviridae</i>	Tipo TMV	SIRV-1
Pleomórfico	DNA 2,C,S	<i>Plasmaviridae</i>	Invólucro,lípidos, sem cápside	L2
		<i>Fuselloviridae</i>	Forma de limão	SSV1
		<i>Salterprovirus</i>	Forma de limão	His1
		<i>Guttaviridae</i>	Forma de gota	SNDV
		<i>Ampullaviridae*</i>	Forma de garrafa	ABV
		<i>Bicaudaviridae*</i>	Duas caudas	ATV
		<i>Globuloviridae*</i>	Tipo paramyxovirus	PSV

* Aguarda classificação: C-Circular: L-Linear: S-Super helicoidal: seg-segmentada: 1-cadeia simples: 2-cadeia dupla

Em 2009, foram aprovados pela ICTV novos sistemas de classificação taxonómicos dos fagos (Carstens, 2010). A ICTV encontra-se a actualizar todas estas aprovações, esperando que estas informações sejam publicadas no nono relatório da ICTV em 2011 (Carstens, 2010)

1.4 Princípios de infecção pelos bacteriófagos

1.4.1 Hospedeiros bacterianos

A história da Microbiologia teve a sua génese no século XVII com a utilização do microscópio por Antonie Van Leeuwenhoek, conseguindo com este instrumento observar numerosos seres invisíveis a olho nu aos quais denominou “animálculos” (Murray *et al*, 2006). O estudo das bactérias começa anos mais tarde por Pasteur e Koch, na segunda metade do século XIX (Brock, 1999). As bactérias são microrganismos procariotas, ubiqüitários, possuindo uma estrutura celular muito simples (Murray *et al*, 2006; Pádua, 2009). Estes microrganismos não possuem membrana nuclear, mitocôndrias, aparelho de Golgi, nem retículo endoplasmático, reproduzindo-se assexuadamente por divisão binária (Struthers e Westran, 2005). A parede celular que rodeia a bactéria é bastante complexa e permite distingui-las em bactérias Gram positivo e Gram negativo. As bactérias Gram positivo (Figura 1.3) apresentam uma parede celular com uma espessa camada de peptidoglicano que por sua vez é formado pelo ácido murâmico, glucosamina e dois açúcares, e uma curta cadeia de quatro aminoácidos (Pádua, 2009).

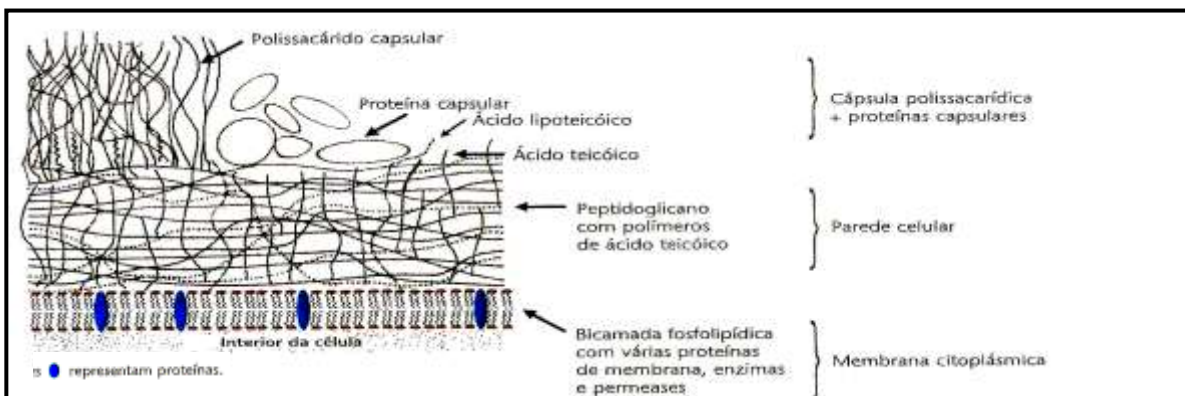


Figura 1.3: Constituição da parede celular de uma bactéria Gram positivo (Adaptado Pádua, 2009)

No caso das bactérias Gram negativo (Figura 1.4) a parede é constituída por uma fina camada de peptidoglicano e por uma membrana externa (apresenta uma face interna constituída por fosfolípidos e uma face externa formada essencialmente por lipopolissacarídeos) (Rosa, 2008; Pádua, 2009). Internamente à parede celular apresenta-se uma membrana citoplasmática constituída essencialmente por fosfolípidos e proteínas (Pommerville, 2009).

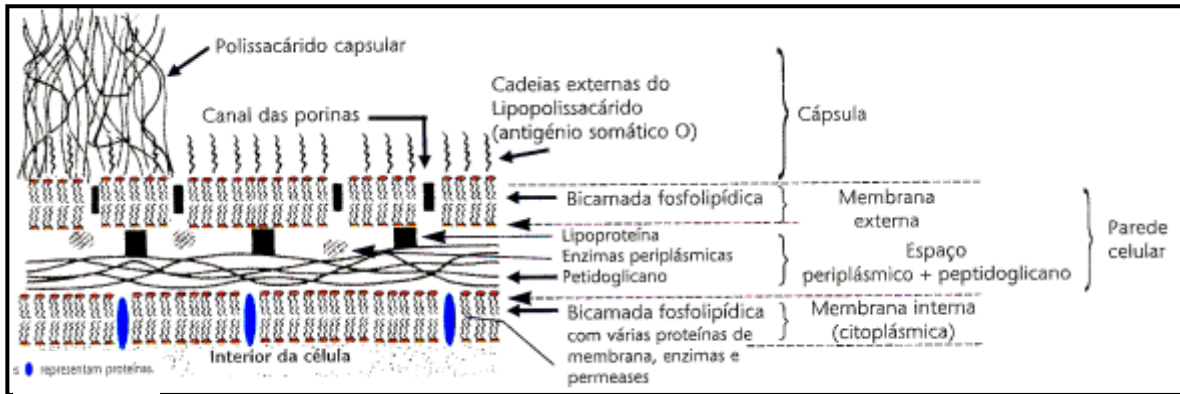


Figura 1.4: Constituição da parede celular de uma bactéria Gram negativo (Adaptado de Pádua, 2009).

Enquanto que há bactérias que não apresentam parede celular, como por exemplo o *Mycoplasma*, existem outras, como as micobactérias que apresentam uma parede celular constituída por três sub estruturas (peptidoglicanos, arabinogalactanas e ácidos micólicos) interligadas covalentemente (Campos, 2006; Dib *et al*, 2006; Hinrichsen, 2007). Os ácidos micólicos são constituídos por longas cadeias de ácidos gordos, que constituem uma barreira impermeável e eficiente, fazendo com que sejam mais resistentes à entrada de químicos que as demais bactérias (Teixeira *et al*, 2007; Krasner, 2010; Niederweis *et al*, 2010).

A flora normal do ser humano é constituída por diversas espécies de bactérias, causando doenças apenas uma minoria destas bactérias (Spicer, 2009). Esta flora bacteriana é importante no combate a infecções, competindo com agentes patogénicos invasores (Pádua, 2009).

A relação entre as bactérias e o ser humano pode assumir a forma de saprofitismo (em que as bactérias não prejudicam o homem resultando desta associação pouca ou nenhuma vantagem para as bactérias); comensalismo (as

bactérias necessitam do ser humano, mas não provocam qualquer tipo de dano no homem, podendo desta associação resultar vantagens para ambos no caso da simbiose ou então não resultar em nenhuma vantagem para o homem) e acção patogénica (as bactérias provocam doença no homem) (Murray *et al*, 2006). As infecções bacterianas emergem do facto das bactérias patogénicas prevalecerem sobre a capacidade do organismo em destruí-las (Spicer, 2009). Pode-se agrupar em dois tipos os factores de patogenicidade que tornam as bactérias mais agressivas: factores invasivos (permitem que a bactéria se multiplique no interior do organismo) e factores toxinogénicos (relacionados com a produção de toxinas pelas próprias bactérias) (Pádua, 2009).

1.4.2 Infecção bacteriofágica

O processo de replicação dos fagos está dependente dos recursos energéticos e materiais do hospedeiro, uma vez que os fagos não possuem metabolismo próprio (Tropp, 2008). Os fagos apresentam um ciclo de replicação comum a muitos vírus, apresentando porém determinadas particularidades (Tropp, 2008). Numa primeira etapa encontramos a adsorção (Tabela 1.2) em que os fagos se ligam a receptores específicos que existem na superfície do hospedeiro (Calender, 2008).

Tabela 1.2: Etapas que caracterizam a adsorção (Adaptado de Kutter e Sulakvelidze, 2005; Calender, 2006)

Principais fases que compõem o processo de adsorção
<p>A adsorção contempla três fases:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Contacto inicial: o contacto inicial entre o fago e a célula é conseguido através de movimentos Brownianos e efeitos de difusão; ▪ Ligação reversível: trata-se de uma ligação fraca, em que as forças electrostáticas têm um papel fundamental numa adesão não específica; ▪ Ligação irreversível: ligações fortes e estáveis. A actuação de enzimas hidrolíticas facilita a passagem de material genético através da parede bacteriana. <p>Quase todas as estruturas bacterianas que se encontram expostas na parede podem ser utilizadas como receptor pelos bacteriófagos. Porém foi descrito um mecanismo indutor de variabilidade no reconhecimento de receptores em fagos que infectam o género <i>Bordetella</i>.</p>

Numa segunda fase temos o desnudamento viral em que a maioria dos fagos através de enzimas tornam a parede bacteriana permeável, podendo a penetração do vírus nas células ocorrer através da injeção do ácido nucleico, endocitose, translocação ou fusão do invólucro fágico (Gregoracci *et al*, 2006). A quantidade de fago que entra nas células é variável (Knipe e Howley, 2007). Por exemplo nos fagos com cauda apenas o material genético e algumas proteínas acessórias entram para o interior da célula (Knipe e Howley, 2007). No caso dos fagos sem cauda, a partícula fágica entra toda na célula passando para o citoplasma (Gregoracci *et al*, 2006; Knipe e Howley, 2007; Goldman e Green, 2009).

A terceira etapa do ciclo bacteriofágico caracteriza-se pela expressão e replicação do ácido nucleico (Shors, 2009). Após a entrada do ácido nucleico fágico numa bactéria podem advir várias respostas possíveis (Tabela 1.3) (Gregoracci, 2006; Shors, 2009).

Tabela 1.3: Respostas possíveis após entrada do material genético fágico na bactéria (Adaptado de Gregoracci, 2006; Hanlon, 2007)

Respostas possíveis após entrada do material genético fágico na bactéria
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Resposta lítica: este tipo de resposta é causada por fagos virulentos, redireccionando o metabolismo do hospedeiro para a produção de fagos que são posteriormente libertados através da lise da célula; ▪ Resposta lisogénica: resposta causada por fagos temperados em que o profago (estado latente do fago) se integra no material genético do hospedeiro; ▪ Resposta pseudolisogénica ou persistente: apesar deste tipo de resposta ser a mais desconhecida acredita-se porém que seja a mais difundida na natureza. Neste caso não existe inserção do material genético no genoma do hospedeiro nem a lise celular; ▪ Respostas do tipo infecção crónica: neste tipo de resposta encontramos os fagos que geralmente não recombina o seu genoma com o genoma do hospedeiro, produzindo baixas quantidades de fago que são libertados sem que ocorra lise celular.

A quarta fase do ciclo de replicação fágica reporta-se à formação de novas partículas fágicas (Hanlon, 2007). Nesta etapa e numa fase pré-inicial, o fago utiliza a maquinaria de síntese da célula hospedeira, preparando a célula para a

produção de macromoléculas (Grath e Sinderen, 2007). Posterior a esta fase segue-se uma fase inicial em que ocorre a síntese de enzimas e substratos que serão fundamentais para a replicação dos ácidos nucleicos (Shors, 2009). Finda esta fase segue-se uma fase final ou tardia em que são sintetizadas proteínas estruturais virais e enzimas necessárias para formação da cápsula e encapsulamento do ácido nucleico (Gregoracci, 2006). Todo este processo ocorre de uma forma sequencial em que depois da síntese de proteínas e ácidos nucleicos é necessário que ambas se juntem para que se formem partículas virais maduras (Comeau e Krisch, 2005).

Na última fase deste ciclo biológico de replicação fágica temos a lise celular em que ocorre a libertação das partículas virais e outros componentes celulares para o meio exterior (Sillankorva, 2004). Este processo de lise é conseguido através da hidrólise do peptidoglicano e a destruição da membrana citoplasmática (Comeau e Krisch, 2005; Grath e Sinderen, 2007).

CAPÍTULO 2

RESISTÊNCIAS AOS ANTIBIÓTICOS

2.1 Breve abordagem sobre a descoberta dos antibióticos

Desde os tempos mais remotos que a elevada mortalidade causada por doenças infecciosas, suscitou nos cientistas a procura de compostos naturais e produtos químicos capazes de combater estas infecções (Walsh, 2003). Aureolus Paracelsus, destacou-se no século XVI pelo uso de compostos de antimónio no tratamento generalizado de infecções e uso de derivados de mercúrio no tratamento de sífilis (Sousa, 2006).

Seguiram-se novas descobertas e avanços científicos e em 1876 Robert Koch apresenta os conhecidos postulados de Koch que permitiram o conhecimento das doenças infecciosas (Pádua, 2009).

Vários estudos e aplicações de produtos naturais e produtos químicos, seguiram-se no tratamento de doenças infecciosas, uns com sucesso outros com muitos limites e complicações, até que em 1928 Alexander Fleming dá o primeiro contributo para o aparecimento da era antibiótica (Walsh, 2003). Este médico e bacteriologista britânico descobre que a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium natatum*, apresentava propriedades antibacterianas (Hoff *et al*, 2008). Não foram necessários muitos anos para que se comesçassem a isolar estirpes de microrganismos resistentes a terapêuticas com penicilina G (Alains, 2005). O *Staphylococcus aureus* foi um dos primeiros microrganismos isolados resistentes à penicilina, devido à produção de β -lactamases (Sousa, 2006). O uso abusivo e indiscriminado de antibióticos ou antimicrobianos fez com que o fenómeno anteriormente referido se proporcionasse noutros microrganismos e com outros antibióticos (Alains, 2005).

As doenças que anteriormente eram facilmente curadas, actualmente são muito difíceis de tratar devido a esta problemática de resistências aos antibióticos (Pádua, 2009).

A resistência a antibióticos constitui mesmo um grave problema de saúde pública, sobretudo a nível hospitalar e a nível Mundial (Hryniewicz e Mazinska 2009).

2.2 Mecanismos de acção dos antimicrobianos

Grande parte dos antimicrobianos utilizados na prática clínica para travar infecções bacterianas pode ser categorizado, de acordo com os cinco principais mecanismos de acção dos antimicrobianos (Tabela 2.1) (Tenover, 2006; Correia, 2009).

Tabela 2.1: Mecanismos de acção dos antimicrobianos (Adaptado de Tenover, 2006; Correia, 2009).

Principais mecanismos de acção dos antimicrobianos
<p>Inibição da síntese da parede celular: os antibióticos que possuem este mecanismo de acção (antibióticos antiparietais) inibem a síntese da parede celular, actuando nas diferentes fases da biossíntese de peptidoglicano. Como exemplos temos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ β-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes e monobactâmicos; ▪ Glicopeptídeos: vancomicina e teicoplanina. <p>Inibição da síntese proteica: antibióticos com este tipo de mecanismo de acção actuam ao nível dos ribossomas 70s. Como exemplos temos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ligação à sub-unidade 50s dos ribossomas: macrólidos, cloranfenicol, lincosamidas (eritromicina, claritromicina, azitromicina, roxitromicina, clindamicina), ácido fusídico; ▪ Ligação à sub-unidade 30s dos ribossomas: aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, estreptomicina, netilmicina, tobramicina) e tetraciclina; ▪ Actuação sobre a peptidiltransferase: espectinomicina, glicilciclina, cetólidos, estreptograminas, mupirocina, evernimicina. <p>Inibição da síntese de ácidos nucleicos: os antibióticos com este tipo de mecanismo de acção actuam inibindo as enzimas que intervêm directa ou indirectamente na síntese de ácidos nucleicos. Como exemplos temos:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inibição da síntese de DNA: quinolonas (ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, levofloxacina); ▪ Inibição da síntese de RNA: rifampicina. <p>Inibição do metabolismo celular: os antibióticos com este tipo de mecanismo de acção impedem a síntese dos co-factores folato que são essenciais para a produção de bases púricas e aminoácidos. Como exemplos temos sulfonamidas e análogos de ácido fólico.</p> <p>Alteração da membrana celular: os antibióticos deste grupo provocam alterações na permeabilidade da parede celular através da interacção com os fosfolípidos. Como exemplos de antibióticos deste grupo temos polimixinas (colistina), gramicidina, tirotricina, daptomicina.</p>

2.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Os mecanismos de resistência bacteriana (Tabela 2.2) apresentam uma elevada complexidade tanto a nível bioquímico como genético, comprometendo a utilidade terapêutica dos antimicrobianos (Sousa, 2006).

A resistência bacteriana a um antimicrobiano pode ser adquirida (no caso dos microrganismos cuja resistência surgiu à medida que se vulgarizou a administração de antibióticos) ou intrínseca (no caso dos microrganismos que se apresentam naturalmente insensíveis a determinados antibióticos) (Cunha 2009; Pádua, 2009). As resistências adquiridas verificam-se quando ocorrem modificações genéticas devido a mutações, rearranjos intramoleculares no DNA ou aquisição exógena de DNA (Correia, 2009; Johnsen *et al*, 2009).

Tabela 2.2: Mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Adaptado de Cunha, 2009)

Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos
<p>Alteração da permeabilidade da membrana externa: redução ou ausência de penetração do antibiótico devido à diminuição ou até mesmo a supressão da permeabilidade da membrana;</p> <p>Alteração dos locais alvo: este mecanismo pode ser dividido em três grupos dependendo da natureza da proteína modificada:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ modificação de enzimas essenciais; ▪ resistência por modificação de proteínas ribossómicas; ▪ alteração dos percursos da parede celular. <p>Modificação enzimática do antimicrobiano: inactivação enzimática do antimicrobiano por efeito de hidrólise ou modificação da estrutura química do antimicrobiano;</p> <p>Bombas de efluxo: saída rápida do antimicrobiano depois de se introduzir na bactéria;</p> <p>Criação de vias metabólicas alternativas: os microrganismos são capazes de crescer, criando uma via metabólica alternativa, apesar da inibição enzimática exercida pelo antimicrobiano.</p>

Do decurso da utilização de antibióticos, as bactérias resistentes podem emergir da selecção de estirpes naturalmente resistentes; selecção/mutação de variantes resistentes; aquisição de novos genes via transposons e transferência genética horizontal (Pádua, 2009).

A maioria dos mecanismos (80 a 90%) que permitem as bactérias escapar à acção de um antibiótico são extracromossómicos (plamídeos e transposons), podendo ocorrer porém alterações nos cromossomas (10 a 20%) (Pádua, 2009).

2.3.1 Resistência em bactérias Gram negativo

Actualmente existem várias bactérias Gram negativo como por exemplo *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*, que apresentam mecanismos de resistência a determinados grupos de antibióticos (Ferreira, 2007; Rossolini *et al*, 2007; Luzarro, 2008; Shanthi e Sekar 2009).

Os β -lactâmicos são o grupo de antimicrobianos mais utilizado no combate a infecções provocadas por bactérias Gram negativo devido à sua elevada toxicidade selectiva, larga diversidade de compostos e elevada eficácia terapêutica (Ferreira, 2007; Tafur *et al*, 2008).

2.3.1.1 β -lactamases de espectro expandido (ESBLs)

A primeira β -lactamase de espectro expandido foi descrita em 1983, derivando na sua maioria de mutações pontuais ocorridas no centro activo das β -lactamases clássicas TEM e SHV (Ferreira, 2007). Estas enzimas são capazes de hidrolizar oximinocefalosporinas, monobactams e penicilinas, sendo sensíveis aos carbapenemes e cefamicinas (Dias, 2009). A sua acção hidrolítica pode ser inibida pelo ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Ferreira, 2007). Tendo em conta a sua origem estas enzimas podem agrupar-se em dez grupos (TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, VEB, TLA, GES, BES e SFO) (Jacoby e Munoz-Price, 2005; Ferreira, 2007; Livermore *et al*, 2007).

A presença de ESBLs, em alguns membros da família *Enterobacteriaceae*, nomeadamente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, assim como a sua presença em bactérias não fermentadoras como a *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* apresentam relevância clínica (Pitout *et al*, 2005; Drieux, 2008).

A produção de ESBLs varia em todo o Mundo, sendo que a sua produção apresenta o seu valor mais elevado na América Latina tanto em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (44,0%) como em isolados de *Escherichia coli* (13,5%) (Reinart *et al*, 2007; Falagas e Karageorgopoulos, 2009). Dados recolhidos pelo *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) e divulgados num Relatório Anual de 2007 referem que a taxa de produção de ESBLs foi de 15,5% para isolados de *Klebsiella pneumoniae* e de 9,8% para isolados de *Escherichia coli* (Falagas e Karageorgopoulos, 2009).

2.3.1.2 AmpC

As β -lactamases classificadas como AmpC, designadas por cefalosporinasas, são capazes de hidrolisar os β -lactâmicos e podem ser de dois tipos: de mediação plasmídica e cromossómica ou indutíveis (Suárez *et al*, 2006; Ferreira, 2007). Bactérias Gram negativo como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, possuem o gene AmpC no cromossoma, ao contrário de outras bactérias como *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella spp.* que adquiriram este gene através de plasmídeos (Suárez, 2006; Jacoby 2009). Entre 2005 e 2006, AmpC β -lactamases mediadas por plasmídeos foram identificadas em 10% de *Klebsiella spp.* e 2% de *Escherichia coli* em cinco crianças hospitalizadas, com enzimas AmpC do tipo DHA-1 (Ding *et al*, 2008). Este achado reflecte a propagação galopante deste tipo de β -lactamases, sendo que os casos mais frequentemente relatados em todo o Mundo são da CMY-2 (Hawkey, 2008; Hawkey e Jones, 2009).

2.3.1.3 Metallo- β -lactamases

As metallo- β -lactamases (MBL) são carbapenemases que são inibidas pelo EDTA, apresentando no seu centro activo pelo menos um átomo de zinco o que facilita a hidrólise de um anel β -lactâmico bicíclico (Ferreira, 2007). As carbapenemases com serina no seu centro activo tiveram a sua génese em 1980 entre as

Enterobacteriaceae, apresentam-se como resistentes ao EDTA, mas sensíveis ao ácido clavulônico e tazobactam (Mendes *et al*, 2006). A descoberta das β -lactamases IMP-1 em *Pseudomonas aeruginosa*, ARI-1 (OXA-23) em *Acinetobacter baumannii* e KPC-1 em *Klebsiella pneumoniae* alterou os padrões de disseminação das carbapenemases (Cornaglia *et al*, 2007; Ferreira, 2007). Existem cinco classes de MBL adquiridas: IMP (Imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase), GIM (German imipenemase) e, mais recentemente, SIM-1 codificada pelo gene *blaSIM-1* (Mendes *et al*, 2006).

O relatório da EARSS de 2007 refere que dos trinta e três países que participaram neste programa, seis países apresentaram taxas de 25% de resistência aos carbapenemes em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, observando-se maior prevalência na Grécia (51%).

A MBL mais dominante na *Pseudomonas aeruginosa* é a VIM-2 (Jeong *et al*, 2009; Khosravi *et al*, 2010). Existem casos clínicos de VIM-2 relatados um pouco por todo o Mundo, como podemos observar na Figura 2.1. Nos países do Mediterrâneo é comum encontrar VIM-1 em *Enterobacteriaceae* (Souli *et al*, 2008). Alguns genes para carbapenemases foram encontrados em determinados microrganismos e regiões geográficas: o gene *blaspm-1* foi encontrado em 70% de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* no Brasil, GIM-1 em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* na Alemanha, SIM-1 em isolados de *Acinetobacter baumannii* e NDM-1 em *Klebsiella pneumoniae* em Nova Déli (Walsh, 2008). Já foram identificados 24 genes de *bla_{IPM}* na China, Taiwan, Itália, Portugal, Áustria e Canada (Harkey e Jones, 2009).

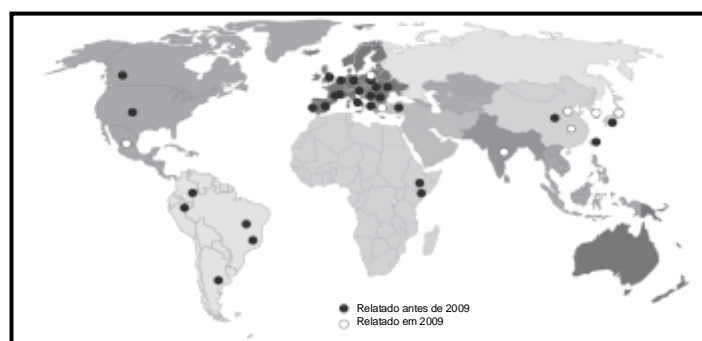


Figura 2.1: Distribuição Mundial de VIM-2 (Adaptado de Harkey e Jones, 2009)

2.3.1.4 Resistência às fluoroquinolonas

Este grupo de antimicrobianos actua ao nível da inibição da topoisomerase II (girase) que é uma enzima fundamental no super enrolamento do DNA (Pádua, 2009). Mutações pontuais ao nível desta enzima conferem resistência da bactéria a este grupo de antimicrobianos (Luzzaro, 2008; Pádua, 2009). Mecanismos de resistência às fluoroquinolonas podem dever-se, porém, à diminuição das purinas, expulsão acelerada do antimicrobiano para fora da célula, sendo que estas resistências eram na sua maioria de natureza cromossómica (Pádua, 2009). Segundo o relatório da EARSS, desde 2001 que se regista um aumento significativo da resistência às fluoroquinolonas, variando estes níveis de resistência de 7% na Estónia e Noruega, a 53% na Turquia em 2007 (Hawkey e Jones, 2009).

2.3.2 Resistência em bactérias Gram positivo

As bactérias Gram positivo têm sido as bactérias mais patogénicas frequentemente isoladas em infecções humanas (Pádua, 2009). Com a introdução da penicilina conseguiram-se tratar as infecções provocadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* entre outras bactérias, até ao aparecimento de resistências a este antibiótico (Lentino *et al*, 2008).

2.3.2.1 *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

O *Staphylococcus aureus* é responsável por uma vasta variedade de infecções que em último recurso pode levar à morte (Kumar e Schweizer, 2005; Arias *et al*, 2008). Com a introdução da penicilina no combate a infecções, apareceram as primeiras resistências a este antibiótico (Klevens *et al*, 2007). Para contornar este problema introduziu-se a meticilina no combate a infecções provocadas por *Staphylococcus aureus*, mas no espaço de um ano o *Staphylococcus aureus* desenvolveu um mecanismo de defesa, emergindo assim o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Harkey e Jones, 2009).

As infecções por MRSA eram exclusivamente adquiridas em ambiente hospitalar, até que no início da década de 90 apareceram os primeiros casos de MRSA adquiridos na comunidade (MRSA-CA) (Huijsdens *et al*, 2006; Arias *et al*, 2008; Popovich, 2008). Em 2007 na Croácia, Grécia, Israel, Malta, Portugal e Turquia a proporção de MRSA encontrados entre pacientes nas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) foi de mais de 60% (EARSS, 2008). Os esforços para contornar as infecções por MRSA em ambiente hospitalar já começam a ser notórios em países como a França, Eslovénia, Turquia, Áustria, Bulgária, Itália, Letónia e Reino Unido onde se verificou uma tendência decrescente de MRSA (EARSS, 2008).

2.3.2.2 Pneumococos resistentes à penicilina

Uma das principais causas de doença em crianças, idosos, imunodeprimidos e portadores de doenças crónicas é a infecção por *Streptococcus pneumoniae* (pneumococos) (Moretti *et al*, 2007; Sousa *et al*, 2009). O pneumococo pode provocar várias doenças, desde infecções da via aérea superior e do tracto respiratório inferior, otite média, e infecções invasivas como é disso exemplo a bacteriémia e a meningite (Tuomanen, 1999; Dias, 2009). O primeiro caso de pneumococos resistente à penicilina foi observado na Austrália e na Nova Guiné (Moretti *et al*, 2007). Dez anos mais tarde registaram-se cinco novos casos de resistência do pneumococos à penicilina num hospital do Sul de África, resultando na morte de cinco crianças (Martinez, 2005). Casos de resistência à penicilina, assim como macrólidos, tetraciclina e cloranfenicol, surgiram noutras zonas do globo terrestre (Lynch e Zhanel, 2009). Um estudo realizado em Portugal demonstrou que até ao ano de 2000 existiu um aumento da resistência à penicilina em isolados de *Streptococcus pneumoniae* invasivos (EARSS, 2008). Em anos posteriores verificou-se uma quebra na resistência a antibióticos β -lactâmicos, podendo esta quebra estar associada à introdução da vacina anti-pneumocócica (PCV-7) em 2001 (Dias, 2009).

2.3.2.3 Enterococos multiresistentes

Nas últimas décadas tem aumentado progressivamente as infecções provocadas por *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina (VRE) (Cubillos *et al*, 2007; Jones *et al*, 2009). As infecções por VRE ocorrem em ambiente hospitalar em pacientes debilitados, expressando-se sob a forma de bacteriémias, infecções urinárias, abscessos ou sépsis (Cubillos *et al*, 2007). Os *Enterococcus spp.*, apresentam uma resistência intrínseca a determinados antibióticos, como são disso exemplo as cefalosporinas, clindamicina e cotrimoxazol (Jones *et al*, 2009). Estes microrganismos apresentam no entanto uma resistência adquirida aos glicopéptidos, especialmente o *Enterococcus faecium*, classificado em vários fenótipos (Pádua, 2009). Os fenótipos que predominam na prática clínica são o VanA (caracteriza-se pela resistência simultânea à vancomicina e teicoplanina) e o VanB (caracteriza-se pela resistência à vancomicina) (Dendle *et al*, 2009). A transferência de plasmídeos, transposons e recombinação ou mutação estão na origem na aquisição de resistências de enterococos (Sousa, 2006). Apesar dos enterococos apresentarem um mecanismo intrínseco de baixo nível de resistência aos aminoglicosídeos, estes microrganismos podem adquirir genes de resistência para estes antibióticos (Emaneini *et al*, 2008). Na Figura 2.2, podemos encontrar a distribuição na Europa de isolados de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina em 2007, segundo um estudo da EARRS.

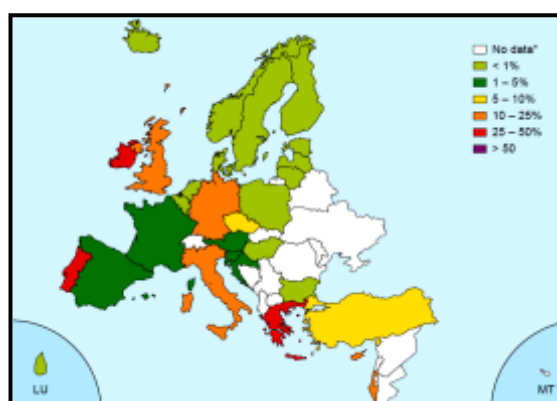


Figura 2.2: Proporção europeia de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina em 2007 (Adaptado de EARRS, 2007)

2.3.3 Resistências em micobactérias

A tuberculose é uma importante causa de doença e morte em todo o Mundo (Garzón *et al*, 2008; Mendoza *et al*, 2008). Estima-se que em 2005 tenham surgido 8,8 milhões de novos casos de tuberculose, causando a morte acerca de 1,6 milhões de pessoas (World Health Organization, 2007). As micobactérias apresentam uma resistência natural a vários antibióticos devido à constituição da sua parede (Coll, 2009). Para que o tratamento seja mais eficaz, este terá de resultar da associação de vários fármacos com um período longo do tratamento (Mendoza *et al*, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o esquema terapêutico recomendado contempla a isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida nos primeiros dois meses e isoniazida e rifampicina até se completarem os seis meses de tratamento (Domínguez *et al*, 2007). Um tratamento de longa duração, a falta da aderência ao tratamento completo tem originado o aparecimento de estirpes multiresistentes (Shi e Suagawara, 2010). Estima-se que em 2006 cerca de 4,8% das estirpes que causaram a tuberculose eram multiresistentes (Coll, 2009). As regiões que apresentam uma maior incidência de micobactérias multiresistentes são a China, a Índia e os países da antiga União Soviética, encontrando-se com menor frequência na América, África e Europa Central e Ocidental (World Health Organization, 2008).

2.3.4 Resistência aos antibióticos no meio ambiente e em animais

Os antibióticos são utilizados com frequência em animais, para fins não terapêuticos, como parte do processo de fabricação de alimentos, especialmente carnes, apresentando benefícios ao nível da saúde animal, maior produção, e em determinados casos, redução de patógenos de origem alimentar (Mathew *et al*, 2007). O uso de antibióticos para fins agrícolas tem contribuído para o aumento da prevalência de bactérias resistentes com significado humano (Heilig *et al*, 2002). Patógenos de origem alimentar como a *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Listeria spp*, *Yersinia spp*. e algumas estirpes de *Escherichia coli* podem estar presentes em animais e serem passadas para os seres humanos (Hawkey e

Jones, 2009). O uso de antibióticos para fins não terapêuticos tem sido controlado e mesmo proibido, o que resultou numa diminuição de bactérias resistentes aos antimicrobianos (Mathew *et al*, 2007). O aumento da mortalidade e morbilidade de animais levou à utilização de antimicrobianos para fins terapêuticos (Gilchrist *et al*, 2007). Por exemplo genes CTX-M-2 de ESBL de *Escherichia coli* foram encontrados em 50% dos peitos de frango importados para o Reino Unido do Brasil (Hawkey e Jones, 2009). Outro exemplo é o clone ST398 MRSA e ST9 susceptível à metilicina que tem como principal reservatório os suínos que são cada vez mais causadores de infecções em humanos (Graveland *et al*, 2010).

2.4 Factores de risco para o desenvolvimento de resistências

Existem várias práticas que estão associadas ao desenvolvimento de resistências a antibióticos (Tabela 2.3), pelo que se torna imperioso actuar de modo mais eficaz no controlo da resistência aos antimicrobianos (Correia, 2009).

Tabela 2.3: Práticas associadas com o desenvolvimento de resistência a antibióticos (Adaptado de Correia, 2009; Cunha, 2009)

Práticas associadas com o desenvolvimento de resistências a antibióticos
<ul style="list-style-type: none">▪ Utilização excessiva e irracional de antibióticos em doentes do ambulatório e hospitalizados, terapêutica ou profilaticamente;▪ Uso de antibióticos na indústria agrícola, nomeadamente na produção de alimentos;▪ Aumento da esperança média de vida com a utilização de antibióticos nos idosos;▪ Avanços da ciência permitem a sobrevivência de muitos doentes com doenças graves e com risco de infecções (imunodeprimidos, doenças congénitas);▪ Medidas ineficazes e não comprovadas de controlo e prevenção de infecção, nomeadamente a lavagem de mãos, restrição do uso de antibióticos assim como o adequado isolamento de pacientes;▪ Utilização cada vez mais frequente de procedimentos invasivos.

2.5 Controlo da resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos contribui para um perigo acrescido, sofrimento prolongado dos pacientes assim como elevados custos dos cuidados de saúde (Correia, 2009). No seguimento desta problemática de saúde pública a União Europeia tomou determinadas medidas tentando porém adequar novas medidas destinadas a controlar este fenómeno (ECDC, 2009). O programa EARSS, financiado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) da comissão europeia reúne estirpes resistentes isoladas de infecções invasivas, de modo a fornecer uma informação actualizada da evolução do perfil de resistência destas estirpes com consequências para a saúde pública (ECDC, 2009). A OMS reconhece que a resistência aos antimicrobianos é um problema grave a nível mundial, afectando os países desenvolvidos e em desenvolvimento (Pádua, 2009). O controlo de resistência aos antimicrobianos poderá desenvolver-se em torno de três aspectos essenciais: utilização eficaz de antibióticos, programas eficazes de controlo da infecção e vigilância epidemiológica (Correia, 2009).

2.6 Novos antibióticos

O aparecimento fulminante de bactérias resistentes a antibióticos tem despoletado o interesse pela descoberta de novos antibióticos (Pádua, 2009). Porém este processo é longo e dispendioso, sendo em média necessários dez anos e investimentos avultados para se colocar um novo antibiótico no mercado (Lopes, 2009). Nos últimos anos tem-se introduzido novos antibióticos na prática clínica (Lopes, 2009; Cui *et al*, 2006). As orientações para pesquisa de novos antibióticos seguem em vários sentidos nomeadamente na pesquisa de novos antimicrobianos mais estáveis na presença de enzimas inactivadoras; inibidores da síntese das enzimas bacterianas inactivadoras; inibidores específicos das β -lactamases e descoberta da fixação ou destruição em novos alvos da bactéria (Pádua, 2009). De entre os novos antimicrobianos utilizados na prática clínica destacam-se a quinupristina-dalfopristina, linezolid, daptomicina e tigeciclina que apresentam elevada eficácia em infecções provocadas por MRSA e VRE (Cui *et al*, 2006). Novas fluoroquinolonas, moxifloxacina e gemifloxacina, associadas com

o cetólido telitromicina e uma cefalosporina oral de terceira geração cefditoren, assumem um papel de relevo em infecções multiresistentes provocadas pelo pneumococo (Cui *et al*, 2006; Lopes, 2009). A tigeciclina apresenta-se como uma nova esperança para o combate de infecções provocadas por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs e *Acinetobacter baumannii* multiresistente (Silva e Nunes, 2010). No combate a infecções provocadas por *Enterobacteriaceae* ESBL positivas podemos também encontrar o ertapenem (Kiremitci *et al*, 2008). Uma nova estratégia no combate de infecções provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente pode ser a utilização de doripenem na terapêutica (Karageorgopoulos e Falagas, 2009; Lopes, 2009).

2.7 Novas alternativas aos antibióticos

Actualmente estão a ser desenvolvidas novas alternativas aos antibióticos de modo a combater a crescente resistência dos microrganismos aos antimicrobianos. Como exemplos de grupos antimicrobianos naturais utilizados como alternativas inovadoras ao uso de antibióticos temos, as hidrolases da parede celular bacteriana, os péptidos antimicrobianos e os fagos (Anisimov e Amoako, 2006; Parisien *et al*, 2008). As hidrolases da parede celular encontram-se divididas em três grupos (lisozimas, autolisinas, e virolisinas), sendo que as virolisinas são a opção mais favorável devido à sua elevada especificidade e capacidade de eliminar bactérias patogénicas, tendo como principal desvantagem os elevados custos de produção (Parisien *et al*, 2008). No caso dos péptidos antimicrobianos, estes pertencem a uma família de proteínas naturais produzidas por organismos eucarióticos e procarióticos ou codificados por fagos (Abdou *et al*, 2007; Batoni *et al*, 2006). Estes péptidos antimicrobianos apresentam uma grande diversidade relativamente à sua estrutura e tamanho, modo de acção e especificidade, apresentando um elevado potencial no âmbito das aplicações terapêuticas clínicas (Toke, 2005; Marr *et al*, 2006; Zaiou, 2007). A terapia fágica é outra das alternativas aos antibióticos em estudo, sendo altamente eficiente, específica e de baixo custo (Borysowski *et al*, 2006; Fischetti *et al*, 2006).

CAPÍTULO 3

TERAPIA FÁGICA: CONCEITOS E APLICAÇÕES GERAIS

3.1 Escolha, isolamento e preparação de fagos para a terapia fágica

A escolha de um ou mais fagos para aplicação na terapia fágica constitui o primeiro passo crítico de todo este processo (Gill e Hyman, 2010). Uma escolha errada de um fago resulta num fracasso do tratamento (Sillankorva, 2004). Uma das vantagens descritas para a aplicação da terapia fágica passa pela facilidade com que se podem isolar novos fagos do meio ambiente (Gregoracci, 2006). Qualquer fonte que contenha o patogénio é susceptível de conter os fagos que lisam esse microrganismo e permitem o isolamento de fagos (Dublanchet, 2009). Depois de isolados os fagos, pretende-se aumentar o seu número, tornando-se necessário arranjar um hospedeiro adequado para que o fago se possa propagar, uma vez que este depende da actividade metabólica do hospedeiro (Gill e Hyman, 2010). Após se obter um rendimento desejado da cultura de fagos, esta cultura não se apresenta pura, pois contém outros componentes para além dos fagos, por exemplo material bacteriano resultante da lise das bactérias, que terá de ser removido (Balogh *et al*, 2010). A preparação de fagos deverá passar por um rigoroso processo de descontaminação de modo a eliminar todos estes artefactos que poderão interferir com a terapia fágica (Merabishvili *et al*, 2009). No final de todo este processo pretende-se obter uma cultura pura de fagos isentos de qualquer tipo de impureza e que proporcionem uma elevada eficácia da terapia fágica, utilizando-se técnicas simples e muito económicas (Hyman e Abedon, 2009). Qualquer falha cometida na escolha, isolamento ou preparação de fagos irá comprometer a eficácia desta terapia (Hyman e Abedon, 2009; Gill e Hyman, 2010).

3.2 Pré-requisitos para a terapia fágica

Antes de se utilizar um fago para determinada terapia deve-se atender a um conjunto de pré-requisitos (Tabela 3.1) (Skurnik e Strauch, 2006). Estes pré-requisitos visam tornar a terapia fágica mais eficiente e minimizar eventuais complicações. Mesmo obedecendo a este conjunto de pré-requisitos, para que um fago seja utilizado como agente terapêutico terá que se ultrapassar um conjunto de barreiras burocráticas e de regulamentação (Kutter *et al*, 2010).

Tabela 3.1: Pré-requisitos para a utilização de fagos na terapia fágica (Adaptado de Skurnik e Straunch, 2006)

Pré-requisitos para a utilização de fagos na terapia fágica
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Não se deve utilizar a terapia fágica sem antes compreender a biologia do fago, uma vez que os sistemas interacção fago-hospedeiro são complicados, esta condição tem muitas vezes que ser confrontada com o senso comum; ▪ As preparações de fagos devem satisfazer todos os requisitos de segurança, devendo estas preparações estarem isentas de bactérias; ▪ O receptor do fago deverá ser conhecido. Numa população de 10^6 a 10^8 bactérias existe uma grande possibilidade de mutantes espontâneos resistentes aos fagos que apresentam um receptor alterado; ▪ A eficácia da terapia fágica deverá ser testada em modelos animais. Cada fago pode ter um comportamento diferente <i>in vivo</i>.

3.3 Aplicações gerais da terapia fágica

3.3.1 Aquacultura

A aquacultura caracteriza-se pela produção de todos os tipos de cultura de animais e plantas aquáticas em água salobra, doce e marinha (Pillary e Kutty, 2005). Apesar do rápido desenvolvimento deste sector existem variáveis como as infecções que resultam em avultadas perdas financeiras (Flegel, 2006; Saksida, 2006). O desenvolvimento de infecções causadas por microrganismos patogénicos, incluindo bactérias multiresistentes, é rapidamente transmitido pela água, infectando uma variedade de espécies de peixes (Almeida *et al*, 2009). Para prevenir e tratar estas infecções em peixes surgiram algumas tentativas utilizando a terapia fágica. Um grupo de japoneses tem estudado o potencial da utilização de fagos para prevenir infecções em peixes provocadas por *Lactococcus garviae* ou *Pseudomonas plecoglossicida* concluindo que a utilização de fagos pode ser útil para o controlo de infecções em peixes (Skurnik and Strauch, 2006; Almeida *et al*, 2009).

3.3.2 Veterinária

A terapia fágica também é aplicada para controlo de infecções animais (Merril, 2008). Os casos relatados mais bem sucedidos reportam-se à utilização de fagos contra infecções provocadas por *Salmonella* em aves e em casos de enterite neonatal provocada por *Escherichia coli* em bezerros, leitões e cordeiros, conseguindo-se obter bons resultados com esta terapia (Henriques, 2008; Atterbury, 2009).

3.3.3 Agricultura

As principais infecções causadas em plantas são de origem fúngica, porém as infecções bacterianas são as responsáveis pelos maiores prejuízos na agricultura (Balogh *et al*, 2010). Estas infecções são muitas das vezes difíceis de controlar devido à falta de bactericidas eficazes (Gent e Schwartz, 2005; Obradovic *et al*, 2005; Ji *et al*, 2006). De modo a superar este problema foram recentemente desenvolvidos e avaliados fagos para controlar algumas fitobactérias (Balogh *et al*, 2008; Balogh *et al*, 2010). Actualmente a implementação da terapia fágica na agricultura como estratégia de gestão de doença inclui o controlo genético, cultural, biológico e químico (Balogh *et al*, 2010). Como exemplo de um fago já disponível temos o agrifago que é eficaz e seguro para prevenção e controlo de bactérias nocivas para tomates e pimentão (Housby e Mann, 2009).

3.3.4 Indústria Alimentar

A utilização recente de fagos ou produtos de fagos na indústria alimentar é actualmente aplicada como um método de controlo biológico de microrganismos patogénicos indesejáveis, aumentando a segurança alimentar, em especial dos alimentos frescos e prontos a comer (Hagens e Loessner, 2010). A indústria alimentar centra o seu interesse em quatro microrganismos patogénicos (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli*) (Rees e Dodd, 2006; Hagens e Offerhaus, 2009). Realizaram-se vários estudos com fagos para

tratar a *Salmonella* e o *Campylobacter* em frangos e para tratar ruminantes infectados com *Escherichia coli* patogénica, observando-se reduções significativas destas bactérias (Fiorentin *et al*, 2005; Atterbury *et al*, 2007). Porém em qualquer um dos casos de estudo não se excluiu um tratamento adicional de fagos após a produção dos alimentos (Hagens e Offerhaus, 2009). No caso da *Listeria* a eficácia da terapia fágica também foi comprovada em vários estudos com vários alimentos infectados com *Listeria* (Hagens e Offerhaus, 2009). Em 2006 a FDA e o Departamento de Agricultura aprovaram uma substância natural e orgânica de fagos anti-*Listeria* que se pode utilizar como ajuda no processamento de todos os produtos alimentícios susceptíveis à *Listeria monocytogenes* (Hagens e Loessner, 2010).

3.3.5 Prevenção e tratamento de infecções humanas

Recentemente renasceu o interesse pela aplicação da terapia fágica na prevenção e tratamento de doenças humanas quer em adultos quer em crianças (Fortuna *et al*, 2008). Vários são os estudos realizados em animais que comprovam a eficácia da terapia fágica face à antibioterapia, sendo que já existem estudos actuais completos de ensaio clínico de fase II realizados em humanos para a infecção do ouvido por *Pseudomonas* entre outros estudos que se encontram na fase I dos ensaios clínicos (Kutter *et al*, 2010).

3.4 Desenvolvimento de produtos fágicos: comercialização

Os primeiros passos ao nível da comercialização de fagos verificaram-se quando estes foram utilizados para identificação bacteriana através da fagotipagem, consistindo esta técnica na utilização de padrões de sensibilidade das bactérias a fagos específicos de modo a identificar com precisão as estirpes microbianas (Housby and Mann, 2009). Neste momento os fagos estão a ser comercializados em várias áreas (Tabela 3.2), uma vez que a terapia fágica se apresenta como uma tecnologia amplamente relevante no âmbito da veterinária, agricultura, microbiologia alimentar e tratamento ou prevenção de infecções humanas (Almeida *et al*, 2009; Housby and Mann, 2009; Kutter *et al*, 2010).

Tabela 3.2: Principais empresas relacionadas com a comercialização de produtos fágicos (Adaptado de Housby and Mann, 2009)

Empresa Localização	Área de produção	Estado de Desenvolvimento
<i>BigDNA</i> Edimburgo (Reino Unido)	Vacinação	Investigação e desenvolvimento
<i>Blaze Venture Technologies</i> Hertfordshire (Reino Unido)	MRSA	Licença
<i>JSC Biochimpharm</i> Tbilisi (República da Georgia)	Mistura de vários lisados de fagos usados para tratar problemas intestinais, por exemplo disenterias, salmoneloses, colites e enterocolites e outras infecções bacterianas	Comercialização
<i>Biopharm L Limited</i> Tbilisi (República da Georgia)	Produtos incluindo piofagos ou intestifagos que são misturas de lisados de fagos para bactérias intestinais ou controlo de infecções, vendido em farmácias	Comercialização
<i>BioControl</i> Southampton (Reino Unido)	Infecção do ouvido provocada por <i>Pseudomonas</i>	Ensaio clínico de fase II concluído
<i>Biophage Pharma Inc.</i> Montreal (Canada)	Diagnósticos e terapias ambientais, produtos de fagos direccionados para os problemas com resistência a antibióticos e como arma contra o bioterrorismo	Investigação e desenvolvimento
<i>EBI Food Safety</i> Wageningen (Irlanda)	Segurança alimentar. <i>Cocktail</i> de fagos contra a <i>Listeria</i> .	LISTEX P100 TM produto disponível
<i>Gangagen</i> Bangalore (Índia) e Palo Alto, Califórnia (Estados Unidos da América)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Pré-clínico
<i>Innophage</i> Porto (Portugal)	Ambiente, cosmética e infecções bacterianas	Desconhecido
<i>Intralytix</i> Baltimore (Estados Unidos da América)	Segurança alimentar, <i>Listeria</i>	Aprovação da FDA e EMEA para queijos e carnes prontos a comer

<i>Neurophage Pharmaceuticals</i> Cambridge, Massachusetts (Estados Unidos da América)	Mudanças ao nível cerebral, por exemplo Alzheimer	Fase inicial da empresa
<i>Novolytics</i> Coventry (Reino Unido)	Prevenção e tratamento de infeções provocadas por MRSA	Pré-clínico
<i>Omnilytics</i> Salt Lake City, Utah (Estados Unidos da América)	Agrifago é eficaz e seguro para prevenção e controlo de bactérias nocivas em tomates e pimentão	Produto disponível no mercado
<i>Phage-Biotech</i> Rehovot (Israel)	Anti- <i>Pseudomonas</i> infecciosas	Investigação e desenvolvimento
<i>Phico Therapeutics</i> Cambridge (Reino Unido)	Produtos anti-MRSA	Pré-clínico
<i>Phage International</i> San Romon, Califórnia (Estados Unidos da América); Trinidad, (Oeste das Índias) e Tbilisi (República da Geórgia).	Centro de tratamento com fagos	Disponível
<i>Special Phage Holdings Pty Ltd</i> Brookvale (Austrália)	Investigação e desenvolvimento	Protótipo de produtos, alguns para ensaio clínico
<i>Targanta Therapeutics</i> Cambridge Massachusetts, (Estados Unidos da América)	Antibióticos	Investigação e desenvolvimento
<i>Viridax</i> Boca Raton, Florida (Estados Unidos da América)	<i>Staphylococcus aureus</i> , respiratório, sistémico, tópico, tratamento de feridas	Pré-clínico
<i>Technophage SA</i> Lisboa (Portugal)	Desenvolvimento de negócios relacionados com a promoção de ensaios clínicos entre outras áreas como a comercialização de produtos fágicos	Desconhecido

CAPÍTULO 4

TERAPIA FÁGICA: APLICAÇÕES CLÍNICAS

4.1 Breve história da terapia fágica na prática clínica

Logo após a descoberta dos bacteriófagos, ainda que envolta de misticismo relativamente à sua natureza e potenciais propriedades terapêuticas, estes começaram a ser utilizados em benefício do homem (Gregoracci, 2006). Em 1919, d'Herelle viu no surto de cólera aviária que surgiu em França uma oportunidade para estudar o comportamento dos fagos (Dublanche e Fruciano, 2008). Durante o Verão de 1919, d'Herelle aplica pela primeira vez a terapia fágica em cinco crianças com disenteria bacilar, que se encontravam internadas no serviço do Professor Hutinel do Hospital *Necker-Enfants-Malades* em França, obtendo sucesso terapêutico em todos os casos (Dublanche e Bourne, 2007). Estavam assim lançados os primeiros passos na história da terapia fágica que se estendeu ao longo de duas décadas, entre as duas guerras mundiais (Deresinski, 2009). Rapidamente este fenómeno transpôs a fronteira francesa e ganhou uma considerável dimensão mundial, sendo porém perseguido por uma crescente controvérsia relativa à natureza viral e eficácia dos tratamentos (Dublanche e Fruciano, 2008). Na década de 1940 generalizaram-se as dúvidas sobre os potenciais da terapia fágica, e com a descoberta da penicilina, os estudos no âmbito da terapia fágica foram perdendo cada vez mais terreno e credibilidade (Fruciano e Bourne, 2007). Com a descoberta dos antibióticos pensava-se que todas as infecções bacterianas estariam controladas, daí que a terapia fágica tenha sido praticamente abandonada nos países ocidentais (Chastel, 2000). A aquisição de resistências das bactérias aos antibióticos não tardou em aparecer e por cada novo antibiótico surgem novas resistências (Baquero, 2000). Neste momento a comunidade científica está numa era pós-antibiótico onde se tenta encontrar soluções para estas resistências. Neste sentido renasce o interesse pela terapia fágica apoiada em vários estudos realizados essencialmente na Europa de Leste. Estes países nunca abandonaram esta terapia, apresentando uma vasta experiência na sua aplicação clínica em seres humanos, não sendo porém estes estudos muito divulgados (Summers, 2001).

4.2 Terapia fágica na Europa de Leste: passado, presente e futuro

Grande parte dos conhecimentos oriundos da aplicação prática da terapia fágica em humanos é proveniente de dois locais: da Geórgia, em particular das investigações realizadas pelo Instituto Eliava de Bacteriófagos, Microbiologia e Virologia situado em Tbilisi e da Polónia em particular do Instituto Hirsfeld de Imunologia e Terapia Experimental (Kutateladze e Adamia, 2008). A Geórgia apresenta uma história rica no que concerne à terapia fágica, o que faz deste país um local privilegiado para a realização de estudos clínicos controlados, sendo o único país do Mundo onde a terapia fágica é utilizada regularmente na prática médica (Kutter e Sulakvelidze, 2005; Häusler, 2006). O Instituto de Hirsfeld na Polónia apresenta uma abordagem diferente, uma vez que a utilização de fagos terapêuticos se apoiou numa vasta gama de aplicações pelos médicos locais, devido a falhas na antibioterapia (Dublanche et al., 2008). Com a entrada da Polónia para a União Europeia o Instituto criou uma clínica própria, estando de momento a organizar-se no sentido da realização controlada de ensaios clínicos (Kutter *et al.*, 2010).

4.2.1 Geórgia

Em 1918, foi criado na República da Geórgia um novo Instituto de Microbiologia para que fossem estudadas doenças infecciosas (Dublanche et al., 2008; Chanishvili e Sharp, 2009). O primeiro director do Instituto, George Eliava, viajou até ao Instituto Pasteur em Paris para adquirir conhecimentos sobre as técnicas mais modernas e equipamentos disponíveis, tornando-se assim colaborador de d'Herelle (Carlton, 1999; Dublanche et al., 2008). Durante as suas viagens e trocas de impressões ambos desenvolvem a ideia de transformar o Instituto Eliava de Microbiologia num centro mundial de investigação de fagos e terapia fágica (Kutateladze e Adamia, 2008). Joseph Stalin (secretário geral do partido comunista da União Soviética, georgiano nativo) também apoiou este projecto e na década de 1930 foi então construído o novo edifício (Summers, 2001). Em 1937, envolto de um complexo sistema político, Eliava acabaria por ser preso pela polícia secreta de Beria sendo posteriormente executado sem julgamento

(Gregoracci, 2006). Apesar da perda do seu líder e da ruptura da ligação de d'Herelle à Geórgia, este Instituto acabaria por prosperar, dedicando-se à criação e produção de preparação de fagos terapêuticos, assim como a produção de vacinas, antisoros e antivirais (Kutateladze e Adamia, 2008). Este Instituto mereceu um lugar de destaque no Ministério da Saúde Soviético, que enviou amostras de bactérias de toda a União Soviética para a realização de testes e desenvolvimento de *cocktails* de fagos, realizando a aprovação e licenciamento destes produtos, tendo como suporte a vasta documentação de ensaios de segurança e eficácia da terapia fágica (Carlton, 1999). Realizaram-se regularmente conferências para explorar a investigação e os avanços da terapia fágica, mas muita informação era tratada com sigilo e raras foram as publicações periódicas sobre esta temática (Duckworth e Gulig, 2002). Na década de 1980 cerca de mil e duzentos trabalhadores do Instituto Eliava produziram cerca de duas toneladas de produtos de fagos, sendo na sua maioria comprimidos e líquidos direccionados para a disenteria e outras doenças diarreicas, para além de preparações líquidas de fagos, direccionadas para a gangrena e infecções purulentas, em que 80% destes produtos eram para o exército soviético (Summers, 2001). Com a ruptura da União Soviética em 1990, instalaram-se momentos de crise no Instituto uma vez que deixaram de poder contar com o apoio financeiro do Ministério da Saúde Soviético deixando de dispor da sua principal base de clientes, o exército soviético (Kutter *et al*, 2010). Em 1995 o Instituto é privatizado, continuando os cientistas a produzir pequenos lotes de trinta litros de *cocktails* de fagos, importantes para o uso em hospitais regionais e para venda no seu centro de diagnóstico, sendo estes hospitais a fonte de estirpes bacterianas patogénicas para a utilização em testes e actualização regular dos seus produtos (Kutateladze e Adamia, 2008). Com a recente reestruturação de grande parte da comunidade científica, o Instituto Eliava transpôs a barreira da academia de ciências da Geórgia, tornando-se um Instituto semi-independente no âmbito do Ministério das Ciências da Educação (Chanishvili e Sharp, 2008). A maioria dos cientistas e médicos da Geórgia defendeu o grande potencial que a terapia fágica apresenta no tratamento de infecções humanas (Dublanche et Fruciano, 2008). Para que tal fosse possível

tornou-se imperioso realizar ensaios clínicos para provar a sua eficácia e determinar a forma mais eficaz dos protocolos nas suas várias aplicações. Neste momento um entrave que se coloca a este aprofundamento e avanço de conhecimentos científicos passa pela fraca adesão no financiamento de estudos mais robustos e apoio no desenvolvimento de protocolos para estudos que serão aceites internacionalmente.

Através de investimentos consideráveis, essencialmente vindos de médicos da Geórgia, conseguiu-se desenvolver uma nova indústria de fagos, *JSC Biochimpharm*, produzindo as suas próprias versões licenciadas de piofago e intestifago, estando já disponíveis nas farmácias de toda a Geórgia, começando a ser exportados para outros países (Housby e Mann, 2009). Em 2008, conseguiram-se alguns avanços no que respeita à produção em grande escala e investigação de fagos, conseguindo-se acrescentar novos produtos, incluindo os fagos em forma de comprimido contra a *Shigella* para a disenteria e fagos contra uma vasta gama de *Salmonella*, assim como uma preparação especializada do fago contra a *Salmonella typhi* (Kutter *et al*, 2010).

4.2.1.1 Principais aplicações clínicas da terapia fágica na Geórgia

O Instituto Eliava fez imensos progressos com base na investigação de fagos, reforçando *cocktails* de fagos para a terapia fágica e desenvolvendo novos alvos para as prostatites e fibrose cística (Kutateladze e Adamia, 2008). Teve um papel preponderante na resolução de problemas ambientais e potencial bioterrorismo, incluindo a monitorização da cólera e outros patógenos entéricos em águas regionais, assim como na detecção e tipagem de antrax, brucelose e difteria (Chanishvili e Sharp, 2008; Kutter *et al*, 2010).

O Instituto desenvolveu diferentes preparações de fagos (Tabela 4.1): preparações de monofagos (fagos contra *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, etc.), e misturas de vários fagos (intestifagos e piofagos), que foram utilizadas em vários domínios da medicina (dermatologia, cirurgia, gastroenterologia, urologia, ginecologia, oftalmologia, entre outros) (Summers, 2001; Chanishvili e Sharp, 2008; Kutateladze e Adamia, 2008).

Tabela 4.1: Exemplos de preparações de fagos desenvolvidos pelo Instituto Eliava: Principais aplicações e resultados obtidos (Adaptado de Chanishvili e Sharp, 2008; Kutateladze e Adamia, 2008; Kutter *et al*, 2010).

Preparação de fagos	Principais aplicações e resultados obtidos
Piofago	<ul style="list-style-type: none"> ▪ É uma das preparações mais conhecidas composta por cinco componentes essenciais: fagos contra <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Streptococcus</i>, <i>Proteus</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i>; ▪ Esta preparação foi utilizada essencialmente em casos de infecções purulentas (ferimentos e complicações oriundas de infecções dermatológicas) sendo também utilizada para tratar problemas relacionados com os sistemas urinário, digestivo e respiratório; ▪ Vários resultados de clínicas e hospitais da Ex-União Soviética foram publicados e indicaram resultados eficazes, especialmente com o combinado fago e antibiótico, em casos de necrose do sistema digestivo; ▪ Recentemente esta preparação de fagos foi utilizada para tratar uma criança de cinco anos à qual foi diagnosticada fibrose cística em 2004, sendo que em 2004 e 2007 foram isolados e identificados dois microrganismos (<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>) responsáveis por infecções secundárias. Antes da aplicação da terapia fágica foram realizadas várias provas com as estirpes isoladas e preparações de fagos, antes da sua administração. A aplicação desta preparação de fagos proporcionou melhoras significativas nesta criança.
Intestifago	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Esta preparação é constituída por fagos contra vários patogénios responsáveis por infecções intestinais: <i>Shigella flexner</i>, <i>Shigella newcastle</i>, <i>Shigella sonnei</i>, <i>Salmonella paratyphi A e B</i>, <i>Salmonella typhimurium</i>, <i>Salmonella enteritidis</i>, <i>Proteus vulgaris</i>, <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Pseudomonas</i> e vários serótipos de <i>Escherichia coli</i> enteropatogénica; ▪ Preparação utilizada com sucesso no tratamento e profilaxia de infecções intestinais; ▪ Amplamente utilizada como profilaxia no exército soviético; ▪ Dados apresentados por Gogoladze (1983, Instituto Eliava) sobre um estudo realizado entre 1976 e 1982 mostraram que neste período das 580 crianças testadas (452 tratadas com intestifago; 100 com antibiótico e 28 com a combinação intestifago e antibiótico), obtiveram-se resultados significativos relativamente ao período de convalescença destas crianças. Este período foi de 9 dias para as crianças tratadas com intestifago, 29 dias

<p>Intestifago</p>	<p>para as crianças tratadas com antibiótico e 15 dias para as crianças tratadas com ambos;</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Em Rustavi, foram tomadas medidas profiláticas utilizando bacteriófagos devido ao elevado número de casos de febre tifóide entre as crianças. Sob supervisão do Dr. K. Katsitadze (dados do relatório do Instituto Eliava, 1974) foram testadas 18577 crianças entre os 4 e os 14 anos (8732 foram administrados fagos sistematicamente; 6988 não sistematicamente e os restantes 2857 não receberam qualquer tipo de fago). As crianças tomaram um comprimido de fago por semana e como resultado da profilaxia observou-se que o número de casos entre as crianças tratadas com bacteriófagos foi reduzido em cinco vezes; ▪ Foram também realizados estudos com a eficácia profiláctica deste intestifago. Entre 27 de Maio e 30 de Setembro de 1962 foram testadas por G. Kiknadze (Instituto Eliava, relatório de 1967) 3614 crianças entre os 4 e 8 anos com fagos, sendo o grupo controlo constituído por 1224 crianças, obtendo-se uma eficácia na profilaxia de 81,8%.
<p>Bacteriófago Estafilocócico</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Esta preparação monoclonal de fagos direccionados contra <i>Staphylococcus</i> foi eficazmente utilizada durante muitos anos pelo Instituto Eliava no tratamento tópico; ▪ Nos finais da década de 1970, o Instituto Eliava tentou desenvolver fagos contra a sépsis crónica e aguda, elaborando também uma via de administração intravenosa destes fagos. Estudos realizados por volta de 1980 com a preparação de fago estafilocócico revelaram uma ampla actividade lítica contra cerca de 1000 estirpes bacterianas controladas, isoladas em casos de infecções purulentas e sépsis, alcançando esta actividade lítica uma média de 91,1% (95,4% contra <i>Staphylococcus aureus</i> e 83,2% contra <i>Staphylococcus coagulase</i> negativos); ▪ No tratamento de infecções em unidades pediátricas obteve-se uma susceptibilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> de 98% e 78,8% para <i>Staphylococcus coagulase</i> negativos; ▪ Foram realizados diversos estudos em várias instituições sendo estudados 653 doentes entre os 15 e 75 anos (355 homens e 298 mulheres), sendo o grupo experimental constituído por 345 pacientes (130 tratados apenas com o preparado do fago e 215 tratados com fagos e antibióticos) e o grupo experimental constituído por 308 pacientes que não foram tratados com fagos. A via de administração do fago dependeu da tipologia e localização da infecção, sendo este preparado utilizado em várias complicações: sépsis aguda e crónica, peritonite, osteomielite, mastite, artrite purulenta,

<p>Bacteriófago Estafilocócico</p>	<p>pneumonia e bronquite crónica, inflamação crónica do sistema reprodutor feminino, entre outras complicações. Deste estudo verificou-se que dos 130 pacientes tratados apenas com fagos 43,8% ficaram totalmente recuperados e 71,2% dos pacientes tratados com fagos e antibióticos recuperaram totalmente;</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Estudos realizados em crianças forneceram resultados interessantes na medida em que o tratamento de infecções estafilocócicas em crianças é mais eficaz do que nos adultos, não se verificando nenhuma reacção negativa do organismo mesmo no uso prolongado de fagos.
<p>FagoBioderm</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Este preparado foi desenvolvido numa parceria do Instituto Eliava com a Universidade Técnica de Tbilisi, consistindo num polímero biodegradável, não tóxico impregnado com bacteriófagos. Este polímero composto de bacteriófagos contem enzimas como as hidrolases, quimotripsina ou lipases para ajudar na cicatrização das feridas; ▪ A eficácia terapêutica do FagoBioderm foi documentada em 107 pacientes com úlceras causadas por diferentes patogénios. Com a aplicação de FagoBioderm 70% dos pacientes ficaram completamente curados; ▪ Um caso de sucesso da aplicação deste preparado registou-se no tratamento de dois lenhadores que desenvolveram queimaduras de radiação. Juntamente com estas queimaduras de radiação locais adquiriram uma infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> multiresistente. Após um mês de tentativas falhadas na administração de antibióticos os médicos decidiram usar o FagoBioderm e verificaram que a drenagem purulenta parou entre 2 a 7 dias, sendo o agente patogénico eliminado ao fim de 7 dias e a úlcera ficou completamente curada ao fim de um mês de tratamento.

Foram também realizados estudos ao nível do tratamento de infecções maxilo-faciais com a aplicação da terapia fágica (Danelia, 2005). Devido a condições anátomo-fisiológicas da cabeça e do pescoço, as infecções maxilo-faciais devem ser cuidadosamente tratadas, devido à rápida disseminação do microrganismo para outras partes do corpo em especial para o cérebro, podendo mesmo provocar a morte (Durnovo *et al*, 2008). Neste caso, a aplicação de FagoBioderm em pó apresentou-se eficiente para prevenir infecções, em especial infecções provocadas por doentes da UCI, cujos dispositivos médicos colocadas na

cavidade oral são um excelente veículo de propagação da flora oral patogénica (Danelia, 2005; Kutateladze e Adamia, 2008).

Um outro estudo realizado nas UCI veio demonstrar que seguindo um esquema de lavagem diária das salas das UCI e limpeza das paredes, pavimentos e mobiliário com fagos durante a primeira semana após a admissão do paciente, seguindo o mesmo esquema na segunda semana de internamento e diminuindo esta rotina para duas vezes por semana nas semanas seguintes, se conseguiu diminuir significativamente as infeções nosocomiais (Kutter *et al*, 2010).

4.2.2 Polónia

O Instituto Hirsfeld de imunologia e terapia experimental encontra-se localizado em Wroclaw na Polónia. Este Instituto tem fornecido fagos a médicos locais que lidam com infeções resistentes a antibióticos e recorrem muitas vezes à terapia fágica para combaterem estas infeções (Dublanche et al, 2008). Desde 1980 que se tem publicado regularmente uma série de artigos científicos em que descreve a experiência deste grupo de trabalho na Polónia com a terapia fágica, abordando-se porém opiniões sobre a terapia fágica em geral e algumas questões relativamente à purificação dos fagos e economia da terapia fágica (Górski *et al*, 2009). Atentos a todo este fenómeno, não deixaram de explorar também o papel dos fagos endógenos no controlo de bactérias, interação do fago com o sistema imunológico dos animais, e terapia fágica em crianças e pacientes com cancro (Górski e Weber-Dabrowska, 2005; Miedzybrodzki *et al*, 2005; Górski *et al*, 2006; Fortuna *et al*, 2008; Pajtasz-Piasecka *et al*, 2008; Miedzybrodzki *et al*, 2009).

4.2.2.1 Principais aplicações clínicas da terapia fágica na Polónia

Os primeiros tratamentos de terapia fágica humana na Polónia remontam a 1925, sendo utilizado para o tratamento de infeções provocadas por *Staphylococcus* (Cilso *et al*, 1985). O desenvolvimento da terapia fágica evidenciou-se na década de 1940, estando em 1954 este tratamento centrado em Wroclaw no Centro fundado pelo professor Ludwich Hirsfeld (Sulakvelidze *et al*, 2001). Utilizando

fagos específicos da colecção de fagos dos cientistas deste centro de investigação para cada paciente, foram tratados cerca de dois mil pacientes desde 1970, não havendo qualquer tipo de controlo dos ensaios clínicos (Górski *et al*, 2009). A terapia fágica era utilizada como uma última esperança para as sucessivas tentativas falhadas da antibioterapia, sendo grande parte destes casos documentados e publicados, focando o sucesso da terapia fágica assim como eventuais falhas e explicações para o sucedido (Kutter *et al*, 2010). Em 2001, foi documentado que desde 1987 dos mil e quatrocentos pacientes tratados pelo Instituto Hirsfeld, a taxa de cura foi de 90%, sendo esta terapia mais eficaz em casos de otite média purulenta, meningite purulenta e furúnculos (Weber-Dabrowska *et al*, 2001). De acordo com estudos realizados neste Instituto, os fagos foram aplicados directamente em feridas; através de gotas no nariz e ouvidos; infusões em fistulas; lavagem da cavidade nasal; por via intraperitoneal durante a lavagem da cavidade peritoneal e topicamente em casos de abscessos (Kutter *et al*, 2010). O tratamento fágico tem sido muito eficaz em infecções causadas por diferentes espécies bacterianas: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus aureus*, com uma taxa de sucesso de 85%, existindo porém dados publicados que referem que cerca de 2% dos pacientes tratados apresentaram mínimos danos colaterais (Górski *et al*, 2009). Investigadores deste Instituto apresentaram uma descrição do tratamento de septicémias com fagos, em que todos os pacientes tinham sido tratados com antibióticos sem sucesso (Weber-Dabrowska *et al*, 2003). Neste estudo 71 pacientes para além do tratamento continuado com antibióticos também foram tratados com fagos e 23 pacientes apenas foram tratados com fagos (Weber-Dabrowska *et al*, 2003). O tratamento de septicémia com fagos dirigidos a um patógeno específico foi administrado três vezes ao dia (10 mL nos adultos e 5 mL em crianças), trinta minutos antes das refeições, após neutralização do suco gástrico (Weber-Dabrowska *et al*, 2003). No caso de hemoculturas positivas a terapia fágica era direccionada para o microrganismo que crescesse a partir da cultura do sangue, no caso de hemoculturas negativas a terapêutica era direccionada para a bactéria isolada de outros locais (feridas, urina, entre outros) (Weber-Dabrowska *et al*, 2003). O tempo médio de tratamento foi de vinte e nove

dias, observando-se uma taxa de recuperação total dos pacientes em 85,1%, não se observando porém diferenças estatísticas entre os pacientes tratados apenas com fagos e os pacientes tratados com antibióticos e fagos (Weber-Dabrowska *et al*, 2001; Weber-Dabrowska *et al*, 2003).

4.3 Terapia fágica no Ocidente: passado, presente e futuro

Desde 1919 que a terapia fágica tem sido praticada na França, comercializando-se vários *cocktails* de fagos até 1978 (Gregoracci, 2006). Não sendo uma terapêutica de eleição pelos médicos franceses com a chegada dos antibióticos esta prática perdeu terreno (Dublanquet e Fruciano, 2008).

Um reduzido número de médicos ocidentais têm utilizado ocasionalmente a terapia fágica nos últimos anos, na Austrália, Canadá, França, Alemanha e Estados Unidos da América, defrontando-se com um grande problema que passa pela obtenção de preparações adequadas de fagos (Dublanquet, 2009). O processo de reintrodução da terapia fágica devidamente aprovada no Ocidente apresenta-se moroso tornando difíceis os estudos nesta área.

Já foram realizados alguns ensaios clínicos de fase I em voluntários saudáveis (receberam o fago T4 de *Escherichia coli* via oral), através da empresa Nestlé (Suíça), que se encontra activamente envolvida neste projecto (Bruttin e Brüssow, 2005).

Recentemente foram relatados três casos na literatura que mostram avanços nos ensaios clínicos na aplicação da terapia fágica: otites provocadas por *Pseudomonas* (fase I/II de ensaio clínico na Grã-Bretanha); experiência belga em infecções de queimados e alguns ensaios clínicos de fase I iniciados por médicos em Lubbock no Texas (Kutter *et al*, 2010).

4.3.1 Otites provocadas por *Pseudomonas*: fase I/II de ensaio clínico na Grã-Bretanha

A otite crónica é uma patologia muito comum mas difícil de tratar, por conseguinte esta patologia tem sido alvo de estudo por uma empresa britânica de terapia

fágica, *Biocontrol Limited* (Wright *et al*, 2009). Nestes casos as bactérias estão na sua maioria organizadas em biofilmes estando por conseguinte mais protegidas de antibióticos e de células do sistema imunitário, sendo este tipo de infecções difíceis de erradicar (Post *et al*, 2007). A maioria das estirpes que causam esta infecção, geralmente provocada pela *Pseudomonas aeruginosa*, tornam-se resistentes ao tratamento com antibióticos, devendo-se controlar o uso de aminoglicosídeos devido ao efeito tóxico que poderá contribuir para a perfuração da membrana timpânica, além da sua acção nefrotóxica (Carmeli *et al*, 2003; Wright *et al*, 2009). Estudos bem sucedidos da aplicação de fagos em cães com infecções do ouvido provocadas por *Pseudomonas* por este grupo de investigação abriram portas para estudos realizados em humanos (Soothill *et al*, 2004). Este estudo realizado pela *Biocontrol Limited* teve como objectivo primordial avaliar a eficácia e segurança de uma preparação terapêutica de fagos (*Biophage-PA*), em casos de otite crónica provocada por *Pseudomonas aeruginosa* resistentes aos antibióticos (Wright *et al*, 2009). Este ensaio clínico controlado da aplicação de uma preparação de fagos mostrou-se eficaz e seguro em casos de otite crónica provocada por *Pseudomonas aeruginosa*, estando neste momento a *Biocontrol* empenhada em prosseguir para a fase III dos ensaios clínicos, fazendo um esforço para se avançarem com estudos da aplicação do *Biophage-PA* em outras infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, nomeadamente em queimados e crianças com fibrose cística (Wright *et al*, 2009; Kutter *et al*, 2010).

4.3.2 Infecções em queimados: fase I dos ensaios clínicos na Bélgica

Desde há muito tempo que um grupo de cirurgiões e cientistas belgas se tem interessado pela terapia fágica em infecções em queimados (Church *et al*, 2006). Desenvolveram uma ligação muito forte com os cientistas de Moscovo e de Tbilisi tentaram movimentar esforços para o desenvolvimento e aplicação da terapia fágica, chegando mesmo a criar uma organização internacional sem fins lucrativos para a promoção da investigação e realização de ensaios clínicos, num âmbito regulamentado (Kutter *et al*, 2010).

Apesar dos grandes avanços da medicina no tratamento de queimados, as infecções em queimados continuam a ser a principal causa de mortalidade e morbidade, uma vez que estas infecções são frequentemente incuráveis, sendo causadas na sua maioria por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Altöparlak *et al*, 2004). Relatos de experiências de tratamentos de sucesso de infecções provocadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ou *Proteus* em queimados na Polónia mostraram resultados satisfatórios com a terapia fágica, sendo também observados casos de sucesso em queimados no Egipto entre outros casos de sucesso (Marza *et al*, 2006).

Apoiados nestes casos de sucesso e em conhecimentos fundamentados oriundos essencialmente da Europa de Leste, este grupo de belgas avança com ensaios clínicos de fase I para um estudo de segurança com fagos em indivíduos queimados com infecções provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* e/ou *Staphylococcus aureus* no *Burn Wound Centre* em Bruxelas, após aprovação de um comité de ética médica (Kutter *et al*, 2010). Para a realização deste estudo utilizou-se um *cocktail* de fagos BFC-1 composto por três fagos (um Myovirus e um Podovirus contra a *Pseudomonas aeruginosa* e um Myovirus contra o *Staphylococcus aureus*), previamente testados, não se observando qualquer tipo de alterações clínicas ou laboratoriais que se relacionassem com a aplicação de fagos (Merabishvili *et al*, 2009). O uso empírico de antibióticos tópicos e sistémicos esteve na origem de uma baixa contagem bacteriana o que dificultou tirar conclusões acerca da aplicação da terapia fágica (Merabishvili *et al*, 2009).

Estão também a ser realizados estudos no âmbito do desenvolvimento de matrizes adequadas para a aplicação de fagos em feridas, nos olhos e ouvidos, através de experiências realizadas *in vitro*, envolvendo também equipas de farmacêuticos, assim como estudos para a descolonização nasal de MRSA com mupirocina ou fago ISP (Kutter *et al*, 2010). Actualmente um novo protocolo está em preparação para se prosseguirem os estudos em queimados em 2010, ajuste de preparações com fagos e desenvolvimento de análogos de preparações contra outros agentes patogénicos (Kutter *et al*, 2010).

4.3.3 Ensaios clínicos fase I iniciados por médicos em Lubbock no Texas

Em Lubbock, no Texas o *Wound Care Center* teve uma vasta experiência no tratamento individual de pacientes com úlceras nas pernas, através da aplicação de piofagos oriundos do Instituto Eliava (Sun *et al*, 2008). Aprovada a fase I de ensaio clínico pela FDA, realizou-se um estudo prospectivo, padronizado, duplamente cego para tratar pacientes com úlceras venosas de modo a avaliar a eficácia e segurança da preparação de fagos WPP-201 desenvolvida pela empresa *Intralytix* (Rhoads *et al*, 2009). Esta preparação de fagos era constituída por oito fagos (cinco fagos contra a *Pseudomonas aeruginosa*, dois contra o *Staphylococcus aureus* e um contra a *Escherichia coli*) (Deresinski, 2009). Os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas nos efeitos adversos entre os dois grupos de estudo, não se registando problemas graves decorrentes de qualquer um dos grupos (Rhoads *et al*, 2009).

A realização desta fase I de ensaio clínico não levantou qualquer tipo de preocupação relativamente à segurança clínica do fago WPP-201, por conseguinte a realização da fase II terá como principais objectivos testar a eficácia, estabelecer a dosagem, segurança e condições adequadas para a aplicação desta preparação de fagos (Rhoads *et al*, 2009; Kutter *et al*, 2010).

4.4 Terapia fágica em Portugal

Actualmente Portugal dispõe de duas empresas envolvidas na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos com base nas propriedades dos fagos, a *TechnoPhage* e a *Innophage*. Localizada em Lisboa, a *TechnoPhage* desenvolve alguns dos seus estudos no âmbito do tratamento, diagnóstico e prevenção de infecções bacterianas, não existindo porém informações divulgadas acerca destes estudos (www.technophage.pt). A *Innophage* localizada no Porto, também se encontra a desenvolver estudos na pesquisa e descoberta de fagos para aplicação clínica, estando também envolta de um certo misticismo quanto aos estudos em desenvolvimento (www.innophage.com).

Neste sentido Portugal já se encontra a dar os primeiros passos em estudos para a aplicação de uma terapia eficaz para o tratamento e prevenção de infecções humanas.

4.5 Estudos experimentais: contributo de estudos em animais para o desenvolvimento da terapia fágica em humanos

Um dos primeiros estudos rigorosos realizados em animais surge em 1943 por Dubos *et al*, que investigou o efeito protector de fagos em ratos infectados com *Shigella dysenteriae* (Dubos *et al*, 1943). Smith e Huggins também desenvolveram estudos muito influentes, neste caso com infecções de *Escherichia coli* em ratos e animais de fazendas (Smith e Huggins, 1982). Com este estudo conseguiram demonstrar que uma injeção única de um fago que reconhece o antígeno capsular K1 da *Escherichia coli* era mais eficaz do que injeções intramusculares de vários antibióticos no combate a infecções provocadas por esta bactéria (Smith e Huggins, 1982). Em 1983, estes dois autores avaliaram a eficácia de fagos contra a *Escherichia coli* na profilaxia e tratamento de enterite neonatal em bezerros, leitões e cordeiros, demonstrando-se um elevado grau de protecção (Smith e Huggins, 1983). Estudos realizados em 1991, demonstraram que um fago quando inoculado em simultâneo com qualquer uma estirpe de *Salmonella* entérica, resultava numa redução significativa da mortalidade das aves (Toro *et al*, 2005). Desde 1990 que o número de estudos com animais tem-se expandido, tendo sido relatados benefícios na profilaxia e tratamento de uma série de infecções experimentais tais como: *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina; *Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*; *Clostridium difficile*, *Mycobacterium avium*, *Vibrio vulnificus* e *Escherichia coli*, incluindo as ESBL positivas (Wills *et al*, 2005; Capparelli *et al*, 2006; Danelishvili *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006; McVay, *et al*, 2007; Watanabe *et al*, 2007).

Na tabela 4.2 encontram-se de forma sucinta alguns dos principais estudos experimentais realizados em animais nos últimos anos.

Tabela 4.2: Alguns estudos experimentais em animais recentemente desenvolvidos tendo em vista a aplicação da terapia fágica humana.

Microrganismo	Fagos	Estudo	Referência
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	λ	Potencial terapêutico dos bacteriófagos em animais com infecção pulmonar provocada pela <i>Burkholderia cenocepacia</i>	Carmody <i>et al</i> , 2010
<i>Enterococcus faecium</i>	ENB6 C33	Utilização de terapia fágica em ratos infectados com um isolado clínico de <i>Enterococcus faecium</i> resistente à vancomicina	Biswas <i>et al</i> , 2002
<i>Escherichia coli</i>	Ø9882	Eficácia terapêutica do uso de bacteriófagos em ratos com bacteremia provocada por <i>Escherichia coli</i> ESBL positiva.	Wang <i>et al</i> , 2006
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kpn5	Potencial terapêutico do bacteriófago Kpn5 em ratos com queimaduras e infecções provocadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kumari <i>et al</i> , 2010
	KØ1	Protecção com bacteriófagos KØ1 contra infecções provocadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> em ratos com queimaduras	Malik e Shhibber, 2009
	SS	Potencial terapêutico do bacteriófago no tratamento de pneumonias provocadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> em ratos	Chhibber <i>et al</i> , 2008
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CSV-31	Utilidade de um bacteriófago lítico em infecção provocada por <i>Pseudomonas</i> multiresistentes em ratos	Vinodkumar <i>et al</i> , 2008
	CF1/1,CF1/7,P.a.N1 ,P.a.N2,P.a.N4	Estudo do potencial terapêutico de uma preparação de bacteriófagos em casos experimentais de infecções provocadas por <i>Pseudomonas</i> em ratos	Dzuliashvili <i>et al</i> , 2007
	ØA392	Tratamento de infecções provocadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente ao imipenem em ratos com bacteriófagos	Wang <i>et al</i> , 2006
<i>Staphylococcus aureus</i>	M ^{Sa}	Estudo experimental da terapia fágica em ratos infectados com <i>Staphylococcus aureus</i>	Capparelli <i>et al</i> , 2007
	LS2	Estudo experimental de bacteriófagos contra <i>Staphylococcus aureus</i> presentes em abscessos de coelhos	Wills <i>et al</i> , 2005

4.6 Estudos experimentais: isolamento e caracterização de fagos para o combate a algumas das bactérias mais patogénicas

Actualmente têm-se desenvolvido alguns estudos experimentais que se focam na descoberta e caracterização de fagos para combater algumas das bactérias mais patogénicas responsáveis por infecções no ser humano (tabela 4.3).

Tabela 4.3: Estudos experimentais mais recentes de isolamento e caracterização de alguns fagos para futuros ensaios

Microrganismo	Fagos	Estudo	Referência
<i>Acinetobacter baumannii</i>	AB1	Isolamento e caracterização de um bacteriófago virulento AB1 para o <i>Acinetobacter baumannii</i>	Yang <i>et al</i> , 2010
	phi AB2	Isolamento e caracterização do phi AB2: um novo bacteriófago contra o <i>Acinetobacter baumannii</i>	Lin <i>et al</i> , 2010
<i>Campylobacter jejuni</i>	CPS1-6	Isolamento e caracterização de bacteriófagos específicos para o <i>Campylobacter jejuni</i> .	Hwang <i>et al</i> , 2009
<i>Clostridium difficile</i>	PhiCD119	Estudo de um bacteriófago responsável pela regulação de um gene da toxina do <i>Clostridium difficile</i>	Govin <i>et al</i> , 2009
<i>Mycobacterium</i>	D29	Optimização de um ensaio de amplificação de um bacteriófago para o reconhecimento mais preciso do <i>Mycobacterium avium</i> subespécie paratuberculosis.	Foddai <i>et al</i> , 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	phiMR25	Isolamento e caracterização de um novo bacteriófago, phiMR25, e o seu potencial terapêutico para infecções provocadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	Hoshiba <i>et al</i> , 2010
	φMR11 M ^{Sa}	Potencial dos fagos na prevenção de infecções provocadas por MRSA	Mann, 2008
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Smp14	Caracterização de um novo fago Smp14 para a <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Shen <i>et al</i> , 2007
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Spn_OXC, 3,6,9,11,14,18,19,23 MM1-2008	Comparação genómica da análise de dez fagos temperados direccionados para o <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Romero <i>et al</i> , 2009

CAPÍTULO 5

VANTAGENS DA TERAPIA FÁGICA FACE À ANTIBIOTERAPIA

5.1 Limites e controvérsias da antibioterapia

O aparecimento cada vez mais frequente de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos é actualmente encarado como um grave problema de saúde pública (Parisien *et al*, 2008). O desenvolvimento de novos antibióticos e a modificação de antibióticos já existentes são processos que não conseguem ser suficientemente rápidos para combater esta crescente resistência (Pádua, 2009). O retorno à era pré-antibiótica é cada vez mais uma realidade, de modo a colmatar este grave problema. Uma das principais vantagens da antibioterapia pode também ser vista como uma grande desvantagem, ou seja, o facto de apresentar um amplo espectro, não necessitando de identificação prévia das bactérias envolvidas na infecção, levou ao seu uso abusivo e indiscriminado como tratamento empírico, estando este acto associado à aquisição de resistências bacterianas (Paisano, 2008; Parisien *et al*, 2008). A antibioterapia apresenta neste momento uma série de desvantagens (Tabela 5.1) quando comparadas com outras medidas terapêuticas (Paisano, 2008; Parisien *et al*, 2008; Kutter *et al*, 2010).

Tabela 5.1: Principais desvantagens da antibioterapia (Adaptado de Paisano, 2008; Parisien *et al*, 2008; Kutter *et al*, 2010).

Principais desvantagens da antibioterapia
<ul style="list-style-type: none">▪ Os antibióticos apresentam como alvo não só os microrganismos patogénicos como a microflora normal, o que de certo modo interfere com o balanço microbiano do paciente, podendo causar graves infecções secundárias;▪ Provocam vários efeitos secundários, de entre os quais, desordens intestinais, alergias e infecções secundárias;▪ A administração de doses múltiplas pode estar associada a efeitos colaterais e ao aparecimento de infecções secundárias causadas por fungos;▪ Desenvolver um novo antibiótico é um processo moroso que pode levar anos;▪ Elevados custos relacionados com a produção de antibióticos.

5.2 Vantagens e desvantagens da terapia fágica

Torna-se cada vez mais evidente que os fagos assumem um papel de relevo no tratamento clínico e prevenção de doenças infecciosas (Parisien *et al*, 2008). No caso dos fagos destinados ao uso humano, são requeridos requisitos mais apertados de qualidade, sendo que o seu uso se encontra inteiramente dependente das autoridades de saúde que terão sempre que autorizar a sua utilização no tratamento e prevenção de infecções (Skurnik e Strauch, 2006; Skurnik *et al*, 2007).

Matsuzaki *et al* (2005), enumera de forma resumida as principais vantagens da terapia fágica face à antibioterapia (Tabela 5.2).

Tabela 5.2: Principais vantagens da terapia fágica face à antibioterapia (Adaptado de Matsuzaki *et al*, 2005; Clark e March , 2006; Paisano, 2008; Henriques, 2008)

Principais vantagens da terapia fágica face à antibioterapia
<ul style="list-style-type: none">▪ Alta especificidade, atingindo, geralmente, as bactérias alvo;▪ Replicam-se no local de infecção, estando disponíveis onde são mais precisos;▪ A selecção de novos fagos, quando ocorre resistência, é um processo relativamente rápido (podendo demorar dias ou semanas);▪ Atenua a virulência das bactérias que se tornam resistentes ao fago;▪ Administração de uma dose única já que os fagos se propagam enquanto houver bactérias presentes;▪ Bactérias resistentes aos fagos continuam susceptíveis a outros fagos que tenham alvos similares;▪ Efeitos secundários extremamente raros;▪ Baixo custo.

Apesar dos fagos apresentarem baixa toxicidade, a utilização da antibioterapia torna-se vantajosa em casos de infecções sistémicas ao contrário do fago que apresenta mais vantagens quando aplicado localmente (Gregoracci *et al*, 2006). No caso de infecções locais, os antibióticos sistémicos podem não conseguir ter um efeito local desejado devido à hipoperfusão, doenças vasculares oclusivas ou fibróticas, barreiras granulocíticas e necrose dos tecidos, uma vez que a concentração do antibiótico pode não ser suficiente para combater a infecção,

principalmente em feridas extensas (Abedon e Thomas-Abedon, 2010). A eficiência dos antibióticos em feridas é muitas vezes difícil ou impossível, uma vez que o antibiótico se dilui muitas das vezes com o exsudado inflamatório, podendo ocorrer neutralização dos antibióticos por enzimas e outros mediadores inflamatórios (Kutter *et al*, 2010). A capacidade de reprodução dos fagos e a penetração no tecido na presença de bactérias tornam esta terapia mais eficaz quando comparada com a antibioterapia (Parisien *et al*, 2008). No caso de abscessos, já existem alguns estudos realizados em ratos e coelhos que mostram a eficácia da fagoterapia (Wills *et al*, 2005; Capparelli *et al*, 2007). Nestes casos os fagos têm como vantagem alcançar locais mais profundos e daí terem vantagem na terapêutica quando comparados com os antimicrobianos.

Apesar das inúmeras vantagens que esta terapia apresenta restam algumas preocupações, nomeadamente: a libertação de uma grande quantidade de endotoxinas bacterianas ligadas à membrana aquando da lise celular das bactérias; através da conversão lisogénica; neutralização de fagos pelo sistema imunitário do hospedeiro pode resultar em fracasso da aplicação da terapia fágica e possível conversão dos fagos para fagos lisogénicos pode levar à alteração da virulência da bactéria (Tanji *et al*, 2005; Wang *et al*, 2006; Parisien *et al*, 2008). A aquisição de resistência das bactérias aos fagos por diferentes mecanismos é outro dos obstáculos à aplicação da terapia fágica (Tabela 5.3) (Skurnik e Strauch, 2006).

Tabela 5.3: Principais mecanismos de resistência das bactérias aos fagos (Adaptado de Skurnik e Strauch, 2006).

Principais mecanismos de resistência das bactérias aos fagos
<ul style="list-style-type: none">▪ Integração do fago no genoma bacteriano, entrando no ciclo lisogénico;▪ Perda do receptor fágico da superfície bacteriana;▪ Aquisição horizontal de sistemas de modificação que levam à degradação do ácido nucleico injectado;▪ Perda de um gene essencial para a replicação ou montagem do fago.

Apesar deste entrave à aplicação da terapia fágica, a indução de resistências das bactérias aos fagos não é considerada uma grande preocupação, uma vez que

uma vasta gama de estudos realizados mostram que a mutação de fagos acompanha a mutação das bactérias, sendo suficiente para manter a eficácia da terapia fágica (Parisien *et al*, 2008).

Na literatura revista para este trabalho ainda não se encontram descritos casos de resistências das bactérias aos fagos, o que faz com que esta terapia seja apontada como uma alternativa viável para o combate a patógenos resistentes aos antibióticos.

5.3 Breve abordagem à farmacocinética e farmacodinâmica dos fagos no ser humano

Do ponto de vista clínico os fagos parecem ser muito seguros, até porque os seres humanos desde que nascem ficam logo expostos a fagos (Abedon e Thomas-Abedon, 2010). Os fagos são normalmente encontrados no tracto gastrointestinal, pele, urina e boca (Kutter *et al*, 2010). Na União Soviética foram realizados estudos farmacocinéticos e toxicológicos utilizando a administração intramuscular, intraperitoneal ou intravenosa em cobaias, não sendo encontrados sinais de toxicidade aguda ou grave, ou alterações histológicas, mesmo quando se usavam doses superiores às administradas em humanos (Gregoracci *et al*, 2006).

Apesar de não existirem muitos estudos nesta área, os fagos apresentam uma especificidade tão elevada que é difícil prever que ocorram interacções medicamentosas (Wang *et al*, 2006). Por outro lado existem alguns antibióticos que interferem com a terapia fágica, principalmente em infecções localizadas em áreas com má circulação, uma vez que os antibióticos destroem as bactérias necessárias aos fagos para se replicarem e assim terem o efeito desejado no combate a infecções (Abedon e Thomas-Abedon, 2010).

Relativamente à farmacocinética da terapia fágica, enquanto que alguns autores a consideram crucial para o desenvolvimento desta terapia, outros autores não se manifestam muito preocupados com esta abordagem, uma vez que os fagos são altamente eficazes contra as bactérias. Porém pensa-se que existam alguns mecanismos como a existência de várias barreiras ao longo do corpo humano, a

existência do sistema retículo endotelial que rapidamente removem os vírus, uma vez que são considerados corpos estranhos, que podem inibir a acção do fago (Kutter *et al*, 2010).

A farmacodinâmica de uma droga está direccionada para questões como a terapêutica e efeitos tóxicos produzidos, além de considerar as dosagens necessárias para produzir os efeitos desejados. Apesar da segurança que os fagos apresentam podem ocorrer algumas falhas terapêuticas ao nível da farmacodinâmica que poderão passar pela administração insuficiente de fagos para um efeito eficaz contra as bactérias (Skurnik e Strauch, 2006).

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Face à problemática crescente das resistências bacterianas aos antibióticos o interesse pela terapia fágica renasceu no Mundo Ocidental, onde durante muitos anos as potencialidades desta terapia foram desprezadas. Em alguns países da Europa de Leste esta terapia é utilizada como prática médica.

Ainda que muito timidamente, começam a aparecer os primeiros ensaios clínicos em humanos com fagos no Mundo Ocidental. A Grã-Bretanha, Bélgica e Texas já apresentam ensaios clínicos de fase I e II, existindo um estudo que está prestes a iniciar a fase III dos ensaios clínicos. Muitos outros estudos realizados em animais, assim como o isolamento e caracterização de novos fagos contra os microrganismos responsáveis por infecções humanas têm sido realizados um pouco por todo o Mundo.

Os ensaios realizados em animais usando as bactérias mais patogénicas para o ser humano, mostram resultados satisfatórios da aplicação da terapia fágica, mas para que seja aprovada a aplicação no ser humano torna-se necessário haver uma regulamentação.

O conhecimento da Europa de Leste oriundo da experiência da aplicação da terapia fágica, o apoio financeiro de estudos nesta área de investigação e a existência de uma regulamentação, são factores preponderantes para que se aposte na terapia fágica como uma alternativa à antibioterapia em infecções humanas.

Dadas as potencialidades dos fagos em relação aos antibióticos, a terapia fágica apresenta um futuro que se avizinha promissor na sua aplicação na prática clínica, necessitando de mais estudos controlados.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abdou A, Higashigushi S, Aboueleinin A, *et al.* 2007. Antimicrobial peptides derived from hen egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. Food Control 18:173-8.

Abedon S, Thomas-Abedon C. 2010. Phage therapy pharmacology. Curr. Pharm. Biotechnol 11(1):28-47.

Ackermann HW. 2007. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol 152:227-43.

Alains AJ. 2005. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Area?. Archives of Medical Research 36(6):697-705.

Almeida A, Cunha A, Gomes NC, *et al.* 2009. Phage therapy and photodynamic therapy: low environmental impact approaches to inactivate microorganisms in fish farming plants. Mar Drugs 7(3):268-13.

Altoparlak U, Erol S, Ackay M, *et al.* 2004. The time related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. Burns 30: 660-4.

Anisimov A, Amoako K. 2006. Treatment of plague: promising alternatives to antibiotics. J Med Microbiol 55:1461-75.

Arias CA, Rincón S, Chowdhury S, *et al.* 2008. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*: A United States-Colombian Microbial Connection?. N Engl J Med 359(20): 2177-9.

Atterbury R, Bergen M, Ortiz F, *et al.* 2007. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol 73(14):4543-9.

Atterbury RJ. 2009. Bacteriophage biocontrol in animals and meat products. Microb Biotechnol 2 (6):601-12.

Balogh B, Canteros B, Stall B *et al.* 2008. Control of citrus canker and citrus bacterial spot with bacteriophages. Plant Dis 92:1048-52.

Balogh B, Jeffrey B, Iriarte B, *et al.* 2010. Phage Therapy for Plant Disease Control. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11:48-57.

Baquero F. 2000. Natural history of antibiotic resistance of community bacteria. *Rev Pneumol Clin* 1:1S3-6.

Batoni G, Maisetta G, Esin S, *et al.* 2006. Human beta-defensin-3: a promising peptide. *Mini-Rev Med Chem* 6:1063-73.

Biswas B, Adhya S, Washart P, *et al.* 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70(1):204-10.

Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Gorski A *et al.* 2006. Current status and perspectives of phage therapy. *Adv Clin Exp Med* 15:575-80.

Brock T. 1999. Robert Koch – A life in Medicine and Bacteriology. American Society for Microbiology. p.1-6.

Bruttin A, Brüssow H. 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 49(7):2874-8.

Calendar R. 2006. The bacteriophages. 2nd ed. New York: Oxford University Press Inc. p. 37-40.

Campos HS. 2006. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Pulmão RJ* 15(1):29-35.

Capparelli R, Parlato M, Borriello G, *et al.* 2007. Experimental Phage Therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 51(8):2765-73.

Capparelli R, Ventimiglia I, Roperto S, *et al.* 2006. Selection of an *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage for persistence in the circulatory system of mice infected experimentally. *Clin Microbiol Infect* 12:248–53.

Carlton RM. 1999. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 47(5):267-74.

Carmeli Y, Troillet N, Karchmer A, *et al.* 2003. Health and economic outcomes of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa*. Arch Intern Med 159:1127-32.

Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, *et al.* 2010. Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. J Infect Dis. 201(2):264-71.

Carstens EB. 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). Arch Virol 155:133-146.

Chang HC, Chen CR, Lin JW, *et al.* 2005. Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage phiSMA5. Appl Environ Microbiol 71(3):1387-93.

Chanishvili N, Sharp R. 2008. Bacteriophage therapy: experience from the Eliava Institute, Georgia. Microbiol Aust 29(2):96-101.

Chanishvili N, Sharp R. 2009. A literature Review of the Practical Application of Bacteriophage Research. Eliava Institute: Tbilisi, Georgia.

Chastel C. 2000. Félix d'Herelle ou les illusions thérapeutiques du bactériophagie. Virologie 4:466-7.

Chen CR, Lin CH, Lin JW, *et al.* 2007. Characterization of a novel T4-type *Stenotrophomonas maltophilia* virulent phage Smp14. Arch Microbiol 188(2):191-7.

Chhibber S, Kaur S, Kumari S. 2008. Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. J Med Microbiol 57(Pt 12):1508-13.

Church D, Elsayed S, Reid O, *et al.* 2006. Burn wound infections. Clin Microbiol Rev 19:403-34.

Cilso M, Dabrowski M, Weber-Dabrowska B, *et al.* 1987. Bacteriophage treatment of suppurative skin infections Arch Immunol Ther Exp 2:175-83.

Clark J, March J. 2006. Bacteriophage and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. Trends in Biotechnology 24(5):212-8.

Coll P. 2009. Farmacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 27 (8):474-80.

Comeau AM, Krisch HM. 2005. War is peace-dispatches from the bacterial and phage killing fields. *Current Opinion in Microbiology* 8(4):488-94.

Cornaglia G, Akova M, Aminocostante G, *et al.* 2007. Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29:380-8.

Correia C. 2009. Infecções urinárias e susceptibilidade de uropatógenos aos antimicrobianos [dissertação]. Universidade de Aveiro. p. 34-47.

Cubillos AF, Jemenão MI, Bilbao P, *et al.* 2007. Emergencia de infecciones por *Enterococcus* sp resistente a vancomicina en un hospital universitario en Chile. *Rev Chil Infect* 24 (6): 462-71.

Cui L, Tominaga E, Neoh H, *et al.* 2006. Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(3):1079-82.

Cunha BA. 2009. Antibiotic Essentials. 8th ed. Physicians press. p.2.

Danelia T. 2005. Prophylaxis and treatment of the traumatic injuries of maxillo-facial region, complicated with surgical infections. *Tbilisi State Medical University* 5(1):20-1.

Danelishvili L, Young LS, Bermudez LE, *et al.* 2006. *In vivo* efficacy of phage therapy for *Mycobacterium avium* infection as delivered by a nonvirulent mycobacterium. *Microb Drug Resist* 12:1–6.

Dendle C, Ballard SA, Grabsch EA, *et al.* 2009. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* containing both vanA and vanB gene clusters. *J Hosp Infect* 71(4):379-81.

Deresinski S. 2009. Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. *Clinical Infectious Diseases* 48:1096-101.

Deresinski S. 2009. Bacteriophage Therapy: Exploiting Smaller Fleas. *Clinical Infectious Diseases* 48:1096-101.

Dias DJ. 2009. Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogénicas de gram negativo [dissertação]. Universidade Nova de Lisboa. p. 14-6.

Dias RP. 2009. Genetic Diversity and epidemiology of antimicrobial resistance *Streptococcus pneumoniae* isolates [dissertação]. Universidade Nova de Lisboa.p.156-8.

Dib CC, Morais CM, Souza GO, *et al.* 2006. Utilização de uma técnica rápida para o diagnóstico de *Mycobacterium bovis* em amostras de leite experimentalmente inoculadas. Arq. Inst. Biol. 73 (2):149-55.

Ding H, Yang Y, Lu Q, *et al.* 2008. The prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five children's hospitals in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27:915-21.

Domínguez CA, Del Arco A, Canueto QJ, *et al.* 2007. Guía de práctica clínica de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI), sobre el tratamiento de la tuberculosis. Enferm Infecc Microbiol Clin 25:519-34.

Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, *et al.* 2008. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. Clin Microbiol Infect 14(Suppl.1):90-103.

Dublanche A, Bourne S. 2007. The epic of phage therapy. Can J Dis Med Microbiol 18(1):15-8.

Dublanche A, Fruciano E. 2008. Brève histoire de la phagothérapie. Médecine et Maladies Infectieuses 38 (8):415-420.

Dublanche A. 2009. Des virus pour combattre les infections: La Phagothérapie. Favre.

Dubos RJ, Straus JH, Pierce C. 1943. The multiplication of bacteriophage *in vivo* and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. J Exp Med 78:161-8.

Duckworth DH, Gulig PA. 2002. Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. BioDrugs 16(1):57-62.

Durnovo EA, Furman IV, Pushkin SY, *et al.* 2008. Clinical results of the application of perftoran for the treatment of odontogenous abscesses and phlegmons in the maxillofacial region. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 36(3):161-72.

Dzuliashvili M, Gabitashvili K, Golidjashvili A, *et al.* 2007. Study of therapeutic potential of the experimental *Pseudomonas* bacteriophage preparation 147:81-8.

EARSS. 2008. EARSS Annual Report 2007. EARSS Management Team. p. 39-76.

ECDC. 2009. The bacterial challenge: time to recat. European Centre for Disease Prevention and Control.

Emaneini M, Aligholi M, Aminshahi M. 2008. Characterization of glycopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital in Tehran. *Pol J Microbiol* 57(2):173-8.

Falagas ME, Karageorgopoulos DE. 2009. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *Journal of Hospital Infection* 73:345-54.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, *et al.* 2005. *Virus Taxonomy – Eighth Report of the International Committee on Taxonomy Viruses*. San Diego California: Elsevier Academic Press. p.3-33.

Ferreira S. 2007. Detecção de β -lactamases de espectro expandido em *E.coli* e *K. pneumoniae* [dissertação]. Universidade de Aveiro. p. 1-19.

Fiorentin L, Vieira N, Barioni W. 2005. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathol* 34(3):258-63.

Fischetti V, Nelson D, Schuch R. 2006. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nat Biotechnol* 24:1508-11.

Flegel T. 2006. Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* 258:1-33.

Foddai A, Elliott CT, Grant IR. 2009. Optimization of a phage amplification assay to permit accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis cells. *Appl Environ Microbiol* 75(12):3896-902.

Fortuna W, Miedzybrodzki R, Weber-Dabrowska B, *et al.* 2008. Bacteriophage therapy in children: Facts and prospects. *Med Sci Monit* 14(8):R126-32.

Fruciano DE, Bourne S. 2007. Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the west. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 18(1):19-26.

Garzón MC, Angée DY, Llerena C, *et al.* 2008. Vigilancia de la Resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a los fármacos antituberculosos, Colombia 2004-2005. *Biomédica* 28:319-26.

Gent D, Schwartz H. 2005. Management of *Xanthomonas* leaf blight of onion with a plant activator, biological control agents, and copper bactericides. *Plant Dis* 89:631-9.

Gilchrist MJ, Greko D, Wallinga DB, *et al.* 2007. The Potential Role of Concentrated Animal Feeding Operations in Infectious Disease Epidemics and Antibiotic Resistance. *Environ Health Perspect* 115(2):313-6.

Gill JJ, Hyman P. 2010. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 11(1):2-14.

Goldman E, Green LH. 2009. *Practical Handbook of Microbiology*. 2nd. CRC Press. p. 81-101.

Górski A, Kniotek M, Perkowska-Ptasinska A, *et al.* 2006. Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant Proc* 38(1):331-3.

Górski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, *et al.* 2009. Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Curr Opin Investig Drugs* 10(8):766-74.

Górski A, Weber-Dabrowska B. 2005. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell Mol Life Sci* 62(5): 511-19.

Govind R, VEDIYAPPAN G, Rolfe RD, *et al.* 2009. Bacteriophage-mediated toxin gene regulation in *Clostridium difficile*. *J Virol* 83(23):12037-45.

Grath S, Sinderen D. 2007. *Bacteriophage genetics and molecular biology*. Norfolk (UK): Caister academic press. p. 1-43.

Graveland H, Wagenaar JA, Heesterbeek H, *et al.* Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. PLoS One 5(6):e10990.

Greer G. 2005. Bacteriophage control of foodborne bacteria. J Food Prot 68:1102-11.

Gregoracci GB, Silveira WD, Brocchi M. 2006. The biology of bacteriophages. Modern Bacteriophage Biology and Biotechnology.1-36.

Gregoracci GB. 2006. Levantamento de bacteriófagos líticos: isolamento e caracterização de vírus provenientes do esgoto comum com potencial aplicação antimicrobiana [dissertação]. Universidade Estadual de Campinas. p. 1-15.

Hagens S, Loessner M. 2010. Bacteriophages for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. Current Pharmaceutical Biotechnology 11:58-68.

Hagens S, Offerhaus M. 2009. Bacteriófagos: Nueva Arma para la Seguridad Alimentaria. Mundo Lácteo y Cárnio:5-11.

Hambly E, Suttle CA. 2005. The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. Current Opinion in Microbiology 8:444-50.

Hanlon GB. 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. International Journal of Antimicrobial Agents 30:118-28.

Häusler T. 2006. Viruses vs. Superbugs: A Solution to the Antibiotic Crisis. 1.^a Ed: Macmillan: Palgrave Macmillan. p.256.

Hawkey PM, Jones AM. 2009. The changing epidemiology of resistance. JAC 64: i1-i10.

Hawkey PM. 2008. The growing burden of antimicrobial resistance. JAC 62: i1-i9.

Heilig S, Lee P, Breslow L. 2002. Curtailing antibiotic use in agriculture: it is time for action this use contributes to bacterial resistance in humans. West J Med 176(1):9-11.

Henriques AP. 2008. Uso de bacteriófagos para controlo de *Salmonella* em avicultura [dissertação]. Universidade de Aveiro. p. 17-25.

- Hinrichsen SL. 2007. Micobactéria de Crescimento Rápido-MCR. *Prática Hospitalar* 53: 106-11.
- Hoff B, Pöggeler S, Kück U. 2008. Eighty Years after Its Discovery, Fleming's *Penicillium* Strain Discloses the Secret of Its Sex. *Eukaryotic Cell* 7(3):465-70.
- Hoshiba H, Uchiyama J, Kato S, *et al.* 2010. Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage, phiMR25 and its therapeutic potential. *Arch Virol* 155(4):545-52.
- Housby J, Mann N. 2009. Phage therapy. *Drug Discovery Today* 14(11): 536-9.
- Hryniewicz W, Mazinska B. 2009. European Antibiotic Awareness Day-Why needed?. *Pol Merkur Lekarski* 160:261-4.
- Huijsdens Xw, Dijke BJ, Spalburg E, *et al.* 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5:26.
- Hwang S, Yun J, Kim KP, *et al.* 2009. Isolation and characterization of bacteriophages specific for *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Immunol* 53(10):559-66.
- Hyman P, Abedon ST. 2009. Practical methods for determining phage growth parameters. *Methods Mol Biol* 501:175-202.
- Jacoby GA, Munoz-Price LS. 2005. The new beta-lactamases. *N Engl J Med* 352:380-91.
- Jacoby GA. 2009. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 22:161-82.
- Jeong JH, Shin KS, Lee JW *et al.* 2009. Analysis of a novel class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* 47(6):753-9.
- Ji P, Campbell H, Kloepper J, *et al.* 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biol. Control* 36:358-67.
- Johnsen PJ, Townsend JP, Bohn T, *et al.* 2009. Factors affecting the reversal of antimicrobial-drug resistance. *The Lancet Infectious Disease* 9(6):357-64.

Jones FB, Cubillos AF, Andrighetti G, *et al.* 2009. Estudio de factores de riesgo para colonización por enterococo resistente a vancomicina en el Hospital Militar de Santiago. *Rev Chil Infect* 26(4): 374-5.

Karageorgopoulos DE, Falagas ME. 2009. New antibiotics: an optimal use in current clinical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents* 34S:S55-S62.

Khosravi Y, Tee TS, Vadivelu J. 2010. Metallo-beta-lactamase-producing imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a university teaching hospital in Malaysia: detection of IMP-7 and first identification of IMP-4, VIM-2 and VIM-11. *Diagn Microbiol Infect Dis* 67(3):294-6.

Kiremitci A, Dinleyici EC, Erben N, *et al.* 2008. *In vitro* activity of ertapenem and other carbapenems against extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in a tertiary care center in turkey. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 9(9): 1441-9.

Klein Go. 2009. Bacteriophage therapy can be the rescue when antibiotics no longer work. *Lakartidningen* 106(40):2530-3.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, *et al.* 2007. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *JAMA* 298:1763-71.

Knipe DM, Howley PM. 2007. *Fields Virology*. 9nd. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. p. 769-80.

Krasner RI. 2010. *The Microbial Challenge-Science, Disease and Public Health*. 2nd. Jones and Barlett Publishers. p. 69-79.

Kumar A, Schweizer HP. 2005. Bacterial Resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:1486-513.

Kumari S, Harjai K, Chhibber S. 2010. Evidence to support the therapeutic potential of bacteriophage Kpn5 in burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in BALB/c Mice. *J Microbiol Biotechnol* 20(5):935-41.

Kutateladze M, Adamia R. 2008. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Médecine et Maladies Infectieuses* 38(8):426-30.

Kutter E, Sulakvelidze A. 2005. Bacteriophages: biology and applications. United States of América: CRS Press. p. 223-240.

Kutter E, Vos D, Gvasalia G. *et al.* 2010. Phage Therapy in Clinical Practice: Treatment of Human Infections. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 11:69-86.

Lentino JR, Narita M, Yu VL. 2008. New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *Eur J Clin Infect Dis* 27:3-15.

Levine J. 1939. Viruses. Library of congress. Scientific American Library.

Lin NT, Chiou PY, Chang KC, *et al.* 2010. Isolation and characterization of phi AB2 : a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 161(4):308-14.

Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, *et al.* 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *JAC* 59 (2): 165-74.

Lopes HV. 2009. Novos Antibióticos. *Rev Panam Infectol* 11(1):60-1.

Luzzaro F. 2008. Fluorochinoloni e Gram-negativi: differenze di attività e nuove evidenze sui meccanismi di resistenza. *Le infezioni in Medicina* 2(16): 5-11.

Lynch JP, Zhanel GC. 2009. *Streptococcus pneumoniae*: does antimicrobial resistance matter?. *Semin Respir Crit Care Med* 30(2):210-38.

Malik R, Chhibber S. 2009. Protection with bacteriophage KØ1 against fatal *Klebsiella pneumoniae* induced burn wound infection in mice. *J Microbiol Immunol Infect* 42(2):134-40.

Mann NH. 2008. The potential of phages to prevent MRSA infections. *Res Microbiol* 159(5):400-5

Marr A, Gooderham W, Hancock R. 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr Opinion Pharmacol* 6:468-72.

Martinez R. 2005. Resistência do pneumococo à penicilina e aos macrólídeos: implicações no tratamento das infecções respiratórias. *J. bras. pneumol* 31(4): iv-v.

Marza J, Soothill J, Boydell P, *et al.* 2006. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns* 32:644-6.

Mathew AG, Cissell R, Liamthong S. 2007. Antibiotic Resistance in Bacteria Associated with Food Animals: A United States Perspective of Livestock Production. *Foodborne Pathogenes and Disease* 4(2):115-33.

Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, *et al.* 2005. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Inf Chemotherapy* 11:211-9.

McVay CS, Velásquez M, Ralick JA. 2007. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1934–8.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari AC, *et al.* 2006. Metallo- β -lactamases. *J Brás Patol Med Lab* 42(2):103-13.

Mendoza AY, Taraco AG, Carmen P, *et al.* 2008. Tuberculosis: Mecanismos de defensa Inmunopatológico y biomarcadores de susceptibilidad y resistencia. *Ciencia UANL* 10(3): 279-84.

Merabishvili M, Pirnary JP, Verbeken G, *et al.* 2009. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One* 4(3):e4944.

Merril CR. 2008. Interaction of bacteriophages with animals. In *Bacteriophage ecology*. Cambridge University Press: p. 332–52.

Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, *et al.* 2005. Bacterial viruses against virus pathogenic for man? *Virus Res* 110(1-2):1-8.

Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, *et al.* 2009. A retrospective analysis of changes in inflammatory markers in patients treated with bacterial viruses. *Clin Exp Med* 9(4): 303-12.

Moretti GS, Pereira JL, Sakae TM. *et al.* 2007. Vacina pneumocócica: histórico, indicações clássicas e efeitos indirectos. *Pulmão RJ* 16 (2-4):91-6.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2006. *Microbiología Médica*. 5th ed. An Elsevier Imprint. p.7-89.

Niederweis M, Danilchanka O, Huff J, *et al.* 2010. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. *Trends in Microbiology* 18(3):109-16.

Obradovic A, Jones J, Momel M. *et al.* 2005. Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. *Plant Dis* 89(7):712-6.

Pádua MM. 2009. *Patologia Clínica para Técnicas – Tomo I Bacteriologia*. Camarate: Lusociência-Edições Técnicas e Científicas, Lda. p.117-41.

Paisano AF. 2008. Estudo *in vitro* da acção antimicrobiana de bacteriófagos em canais radiculares infectados por isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* [dissertação]. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. p. 24-101.

Pajtasz-Piasecka E, Rossowska J, Dus D, *et al.* 2008. Bacteriophages support anti-tumor response initiated by DC-based vaccine against murine transplantable colon carcinoma. *Immunol Lett* 116(1):24-32.

Parisien A, Allain B, Zhang J, *et al.* 2008. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *Journal of Applied Microbiology* 104:1-13.

Pereira CF. 2009. Uso de bacteriófagos na inactivação de bactérias patogénicas num sistema de aquacultura [dissertação]. Universidade de Aveiro. p. 1-21.

Petty N, Evans T, Fineran P *et al.* 2007. Biotechnological exploitation of bacteriophage research. *Trends Biotechnol* 25:7-15.

Pillay T, Kuttu M. 2005. *Aquaculture: Principles and Practices*: Wiley-Blackwell: Oxford, UK.

Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, *et al.* 2005. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56 (1):52-9.

Pommerville JC. 2009. *Alcamo's Fundamentals of Microbiology*. 8nd. USA: Body Systems Edition. p. 98-110.

Popovich KJ, Weinstein RA, Hota B. 2008. Are community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains replacing traditional nosocomial MRSA strains? Clin Infect Dis 46:787-94.

Post JC, Hiller NL, Nistico L, *et al.* 2007. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 15:347-51.

Rees CE, Dodd CE. 2006. Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food. Adv. Appl. Microbiol.59:159-86.

Reinert RR, Low DE, Rossi F, *et al.* 2007. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. J Antimicrob Chemother 60:1018-29.

Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, *et al.* 2009. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase safety trial. J Wound Care 18(6):237-43.

Romero P, Croucher NJ, Hiller NL, *et al.* 2009. Comparative genomic analysis of ten *Streptococcus pneumoniae* temperate bacteriophages. J Bacteriol 191(5):4854-62.

Rosa DD. 2008. Método rápido de extracção de DNA de bactérias. Summa phytopathol 34(3): 259-61.

Rossolini GM, Mantengoli E, Docquier JD, *et al.* 2007. Epidemiology of infections caused by multiresistant Gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. New Microbiologia 30:332-9.

Saksida S, Constantine J, Karreman G, *et al.* 2006. Evaluation of sea lice, *Lepeophtheirus salmonis*, abundance levels on farmed salmon in British Columbia, Canada. In The Proceedings from the International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics XI: Cairns, Australia.

Shanthi M, Sekar U. 2009. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections among hospitalized patients: risk factors and outcomes. J Assoc Physicians India 57:638-40.

Shi R, Sugawara I. 2010. Development of new anti-tuberculosis drug candidates. Tohoku J Exp Med 221(2):97-106.

- Shors T. 2009. Understanding Viruses. Jones and Bartlett Publishers. p. 595-600.
- Sillankorva S. 2004. Utilização de bacteriófagos no controlo de células suspensas e biofilmes de *Pseudomonas fluorescens* [dissertação]. Universidade do Minho. p.1-5.
- Silva LM, Nunes HR. 2010. Tigecycline: a review of properties, applications, and analytical methods. *Ther Drug Monit* 32(3):282-8.
- Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. 2007. Biotechnological challenges on phage therapy. *Biotechnol Lett* 29:995-1003.
- Skurnik M, Strauch E. 2006. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Microbiol* 296:5-14.
- Smith HW, Huggins MB. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol* 128:307-18.
- Smith HW, Huggins MB. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol*. 129:2659-75.
- Soothill JS, Hawkins C, Anggard E, *et al.* 2004. Therapeutic use of bacteriophages. *Lancet Infect Dis* 4:544-5.
- Souli M, Kontopidou FV, Papadomichelakis E, *et al.* 2008. Clinical experience of serious infections caused by *Enterobacteriaceae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek University Hospital. *Clin Infect Dis* 46(6):847-54.
- Sousa JC. 2006. Manual de Antibióticos antibacterianos. 2ª ed. Porto: Edições Fernando Pessoa. p.15-6.
- Sousa M, Cavadas LF, Santos RB. 2009. Avaliação da qualidade da prescrição da vacina anti-pneumocócica aos idosos. *Rev Port Clin Geral* 25: 531-6.
- Spicer W. 2009. Microbiología clínica y enfermedades infecciosas. Elsevier Limited. p.20-23.
- Struthers J, Westran R. 2005. Bacteriología Clínica. Masson S.A. p.9-20.
- Suárez CJ, Kattán JN, Guzmán AM, *et al.* 2006. Mecanismos de resistencia a carbapenems en *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* y *Enterobacteriaceae* y estrategias para su prevención y control. *Infect* 10(2):85-93.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morraiz J. 2001. Bacteriophage therapy. *Antim Agents and Chemother* 45:649-59.

Summers WC. 2001. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 55:437-51.

Summers WC. 2005. History of phage research and phage therapy. In: Waldor MK, Friedman DI, Adhya L, editors. *Phage - Their role bacterial pathogenesis and biotechnology*. Washington (DC): ASM Press. p. 3-10.

Sun Y, Dowd SE, Smith E, *et al.* 2008. *In Vitro* multispecies Lubbock chronic wound biofilm model. *Wound Repair Regen* 16(6):805-13.

Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. 2008. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio* 12(3):217-26.

Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, *et al.* 2005. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. *J Biosci Bioeng* 100:280-7.

Teixeira HC, Abramo C, Munk ME. 2007. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *J. bras. pneumol* 33(3):323-44.

Tenover FC. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine* 119 (6A): S3-S10.

Toke O. 2005. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers Peptide Sci Sect* 80:717-35.

Toro H, Price SB, McKee AS, *et al.* 2005. Use of bacteriophages in combination with competitive exclusion to reduce *Salmonella* from infected chickens. *Avian Dis* 9:118-24.

Tropp BE. 2008. *Molecular Biology-Genes to Proteins*. 3nd. Jones and Bartlett Publishers. p. 211-264.

Tuomanen E. 1999. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr Opin Microbiol* 2:35-9.

Vinodkumar CS, Kalsurmath S, Neelagund YF. 2008. Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Indian J Pathol Microbiol* 51(3):360-6.

Walsh C. 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. ASM Press: Washington.

Walsh TR. 2008. Clinically significant carbapenemases: an update. Curr Opin Infect Dis 21: 367-71.

Wang J, Hu B, Xu M, *et al.* 2006. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Med 17:309–17.

Wang J, Hu B, Xu M, *et al.* 2006. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. Int J Mol Med 17:347-55.

Wang J, Hu B, Xu M, *et al.* 2006. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* 17(2):309-17.

Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, *et al.* 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. Antimicrob Agents Chemother. 51:446–52.

Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. 2001. Bacteriophage therapy for infections in cancer patients. Clin Appl Immunol Rev 1(3-4):131-4.

Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Górski A. 2003. Bacteriophages as an efficient therapy for antibiotic-resistant septicaemia in man. Transplant Proc 35(4): 1385-6.

Weber-Dabrowska K, Switala-Jelen K, Opolski A, *et al.* 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. Journal of Applied Microbiology 98(1):7-13.

Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. 2005. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. Antimicrob Agents Chemother. 49:1220-1.

World Health Organization. 2007. Global Tuberculosis control-surveillance, planning, financing. Geneva: World Health Organization. p.376.

World Health Organization. 2008. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis

Wright A, Hawkins C, Angg E, *et al.* 2009. A controlled clinical trial of therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a preliminary report of efficacy. Clin Otolaryng 34(4):349-57.

www.innophage.com [acedido em 7 de Julho de 2010].

www.technophage.pt [acedido em 7 de Julho de 2010].

Yang H, Liang L, Lin S, *et al.* 2010. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. BMC Microbiol 10:131.

Zaiou M. 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. J Mol Med 85:317-29.